

Günter F. Triphaus

**ALTERNABHÄNGIGE VERÄNDERUNGEN DER CHEMISCHEN UND
MAKROMOLEKULAREN STRUKTUR UND DES STOFFWECHSELS
VON PROTEOGLYKANEN IM PROCESSUS XIPHOIDEUS (SCHWERT -
FORTSATZ) DES MENSCHEN.**

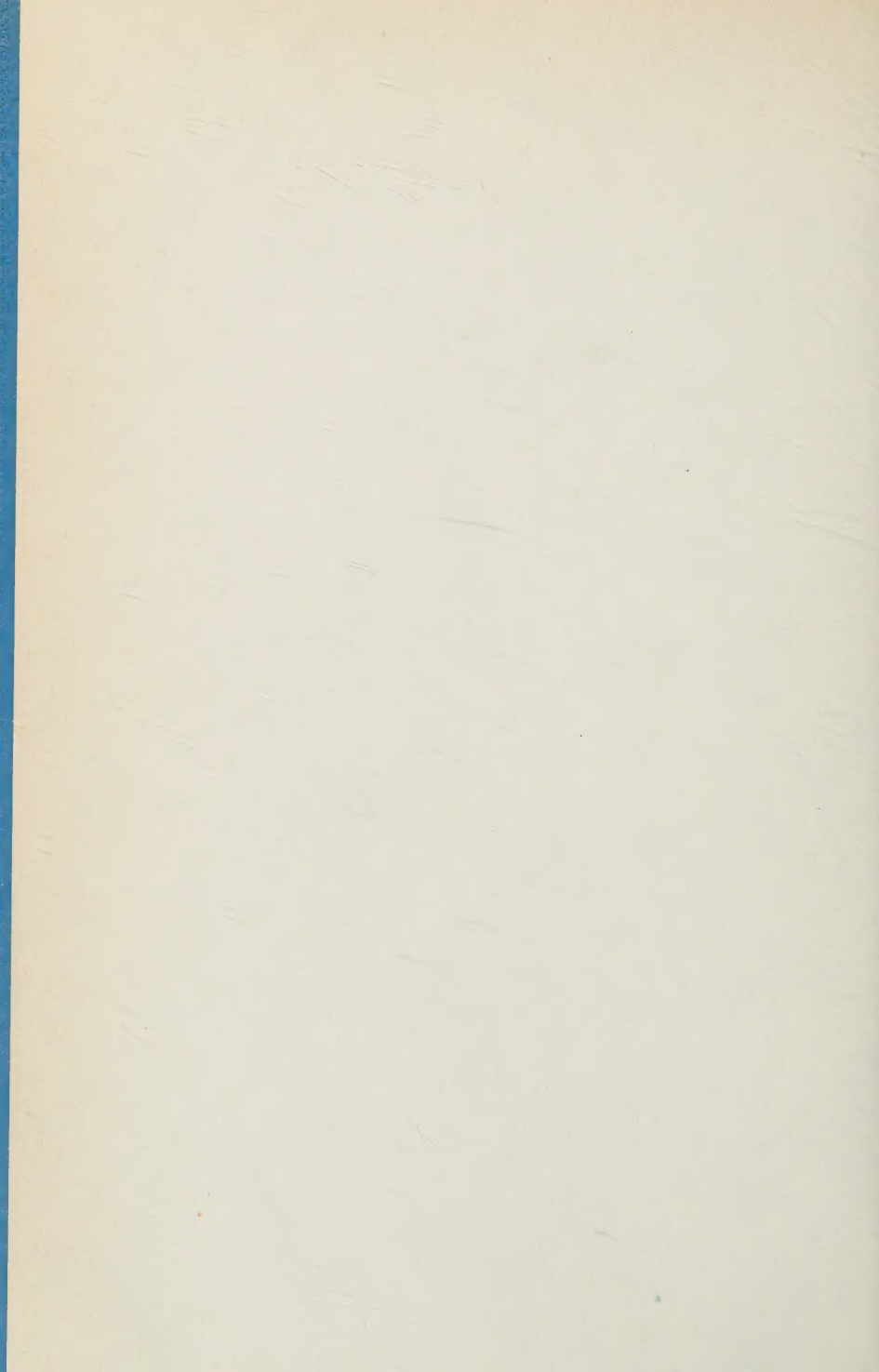
1980

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555410_0019



Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

ALTERNABHÄNGIGE VERÄNDERUNGEN DER CHEMISCHEN UND MAKRO-
MOLEKULAREN STRUKTUR UND DES STOFFWECHSELS VON PROTEO-
GLYKANEN IM PROCESSUS XIPHOIDEUS (SCHWERTFORTSATZ) DES
MENSCHEN.

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fachbereiche

5 Vorklinische und Theoretische Medizin und

6 Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Günter F. Triphaus
aus Meppen/Ems
1979



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Referent: Prof.Dr.E.Buddecke

Korreferent: Prof.Dr.H.Kresse

ALTERNABSABHÄNGIGE VERÄNDERUNGEN DER CHEMISCHEN UND MAKRO-
MOLEKULAREN STRUKTUR UND DES STOFFWECHSELS VON PROTEOGLYKANEN
IM PROCESSUS XIPHOIDEUS (SCHWERTFORTSATZ) DES MENSCHEN.

Günter F.Triphaus

Die Untersuchungen umfaßten folgende Parameter:

- a) Chemische Charakterisierung durch quantitative Bestimmung des Hexosamin-, Protein-, Uronsäure- und Galactosegehaltes,
- b) Ermittlung der molekularen Dispersität der Proteoglykane durch Fraktionierung an Sepharose 4B,
- c) Trennung der am Aufbau der Proteoglykane beteiligten Glykosaminoglykane durch Dünnschichtchromatographie mit photographischer Dokumentation und Quantifizierung durch densitometrische Auswertung, durch enzymatischen Abbau mit Chondroitinase AC und anschließender Gelfiltration auf Sephadex G 25 und
- d) Bestimmung der spezifischen Radioaktivität der Proteoglykane bzw. Glykosaminoglykane nach in vitro Inkubation des Processus xiphoideus in Gegenwart von ^{35}S -Sulfat sowie die Bestimmung der in der Zeiteinheit in eine definierte Gewichtsmenge Knorpelgewebe inkorporierten Gesamtaktivität.

Die unter a - d genannten Parameter wurden an 26 Gewebeproben bzw. 6 Altersklassen ermittelt. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die Gesamtproteoglykane nehmen während der ersten beiden Lebensdezennien zu und im weiteren Lebensverlauf ab. Gleiches Altersprofil zeigen spezifische und pro Gramm Knorpelgewebe inkorporierte ^{35}S -Gesamtradioaktivität.
2. Bei Fraktionierung der Proteoglykane an Sepharose 4B lassen sich mit zunehmendem Alter zwei weitere Fraktionen mit definiertem geringeren Molekulargewicht nachweisen.
3. Das Chondroitinsulfat/Keratansulfatverhältnis in den Proteoglykanfraktionen der Altersklassen ist charakteristischen altersabhängigen Veränderungen unterworfen.
4. Der Vergleich der spezifischen Radioaktivitäten und der Gesamtradioaktivitäten (Maß für die Syntheserate) in den Proteoglykanfraktionen jeder Altersklasse läßt die Deutung zu, daß das von den Knorpelzellen synthetisierte zu Beginn des Lebens hochmolekulare Proteoglykanmolekül extrazellulär zu Spaltprodukten mit geringerem Molekulargewicht abgebaut wird. Dieser Prozeß nimmt altersabhängig zu.

Dekan:

Prof. Dr. H. Themann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Buddecke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kresse

Tag der Promotion: 1. 02. 1980

In Erinnerung an meine Eltern

1.0	Einleitung	1
1.1	Allgemeines	1
1.2	Chemie und Stoffwechsel des Knorpelgewebes	2
1.3	Alternsabhängige Veränderungen der Glykosamino- glykane des Knorpelgewebes	2
1.4	Alternsabhängige Veränderungen der Proteoglykane des Knorpelgewebes	4
1.5	Stoffwechsel der Glykosaminoglykane in Abhängig- keit vom Lebensalter	9
2.0	Problemstellung	11
3.0	Material und Methoden	13
3.1	Untersuchungsgut	13
3.2	Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Knorpelgewebes	13
3.3	In vitro Inkubation des Knorpelgewebes in Gegen- wart von ^{35}S -Sulfat	16
3.4	Isolierung und Fraktionierung der Proteoglykane und Glykosaminoglykane	17
3.4.1	Extraktion und Äthanol-fällung	17
3.4.2	Gelfiltration auf Sepharose 4B CL	18
3.4.3	Gelfiltration auf Sephadex G 25	19
3.5	Analysen	20
3.5.1	Vorbereitung der Proben zur quantitativen Be- stimmung von Hexosamin und Galactose	20

3.5.2	Quantitative Hexosaminbestimmung	22
3.5.3	Enzymatische Galactosebestimmung	25
3.5.4	Quantitative Uronsäurebestimmung	26
3.5.5	Quantitative Proteinbestimmung	27
3.5.6	Radioaktivitätsmessungen	28
3.5.7	Densitometrische Bestimmung des Chondroitin- sulfat/Keratansulfatverhältnisses	28
3.5.7.1	Proteolytischer Aufschluß	28
3.5.7.2	Dünnschichtchromatographie	29
3.5.7.3	Densitometrie	30
3.5.8	Darstellung von Keratansulfat durch enzymati- schen Abbau mit Chondroitinase AC	30
4.0	Ergebnisse	31
4.1	Chemische Zusammensetzung und spezifische Radio- aktivität der aus dem Knorpelgewebe extrahierbaren Proteoglykane	31
4.2	Fraktionierung der Proteoglykane des Processus xiphoideus durch gelchromatographische Trennung unter dissoziativen Bedingungen	39
4.3	Alternsabhängige Veränderungen der Molekular- gewichtsverteilung der Proteoglykane	42
4.4	Alternsabhängige Veränderungen der spezifischen Radioaktivität und chemischen Zusammensetzung der durch Gelchromatographie getrennten Proteoglykan- fraktionen	42
4.5	Verteilungsmuster und Radioaktivität von Chon- droitinsulfat und Keratansulfat der Proteoglykan- fraktionen a - c	51
4.6	Spezifische Radioaktivität und Syntheseraten von Chondroitinsulfat und Keratansulfat	57

5.0	Diskussion	61
5.1	Untersuchungsgut und methodische Voraussetzungen	61
5.2	Chemische und makromolekulare Alternsveränderungen des PGS	63
6.0	Zusammenfassung	70
7.0	Verzeichnis der Abkürzungen	73
8.0	Literatur	75
9.0	Lebenslauf	81

1.0 Einleitung

1.1 Allgemeines

Bindegewebe höherer Organismen verbinden, unterteilen und durchsetzen alle Organe, treten aber auch in spezifischen Organisationsformen auf. Neben der Stütz- und Gewebefunktion erfüllt das Bindegewebe wichtige Aufgaben beim Stofftransport und der Wasserbindung im Interstitium, bei der Kontrolle der Permeabilität und Diffusibilität der extrazellulären Matrix und bei Abwehrfunktionen (1-6).

Die Bedeutung des Bindegewebes für die Medizin liegt in der Bereitschaft mesenchymaler Gewebe zu unspezifischen aber uniformen Reaktionen. Sie äußern sich darin, daß exogene oder endogene Reize (Hormone, Sensibilisierung durch Fremdeiweiß, Toxine u.a.) reaktive Veränderungen an den verschiedenen mesenchymalen Organen hervorrufen (7), und enge pathogenetische Beziehungen zu zahlreichen Erkrankungen des Bindegewebes - wie z.B. zum Rheumatismus und zur Arteriosklerose - bestehen. Das bessere Verständnis der Biochemie und Pathobiochemie des Bindegewebes wird zu neuen Erkenntnissen über die Pathogenese und weiterführenden Aspekten für die Therapie zahlreicher Erkrankungen führen.

Das besondere Interesse der Gerontologie am Bindegewebe geht auf die Tatsache zurück, daß sich alternsabhängige Veränderungen an zahlreichen Bindegeweben beobachten und auch quantifizieren lassen. Obwohl eine Abgrenzung zwischen krankhaften Prozessen und Alternsveränderungen eines Individuums nicht immer möglich ist, lassen sich bestimmte Erkrankungen (z.B. Arthrosen, Trichterbrust) als vorzeitige - durch unbekannte pathogenetische Mechanismen ausgelöste - Alterungsprozesse erklären. Für die Trichterbrust wurde z.B. ein um 10 Jahre vorverlegter - sonst erst im höheren Lebensalter beobachteter - Anstieg des Keratansulfatgehaltes im Rippenknorpel gefunden (8).

Die Beurteilung eines Bindegewebes, insbesondere seiner morphologischen Charakteristika, seiner Alternsveränderungen und gegebenenfalls seiner Erkrankungen, stützt sich auf licht- und elektronenmikroskopische, röntgeninterferometrische und biochemische Methoden.

1.2 Chemie und Stoffwechsel des Knorpelgewebes

Für das Studium von quantitativen und qualitativen biochemischen Alternsveränderungen bietet das Knorpelgewebe besonders günstige Voraussetzungen:

Einmal sind die in der Extrazellulärsubstanz lokalisierten Glykosaminoglykane (GAG) Chondroitinsulfat und Keratansulfat bzw. ihre Proteinkomplexe (CS- und KS-Proteoglykan) in ihrer chemischen Struktur weitgehend aufgeklärt (9-12) und detaillierten Analysen zugänglich. Zum anderen bietet das Knorpelgewebe aufgrund seines geringen Sauerstoffverbrauchs (13) die Möglichkeit für In-vitro-Inkorporationsversuche und eignet sich damit bevorzugt für Stoffwechselstudien (14).

1.3 Alternsabhängige Veränderungen der Glykosaminoglykane des Knorpelgewebes

Alternsabhängige Veränderungen der in der optisch amorphen Grundsubstanz enthaltenen Verbindungen können quantitativer Natur sein, d.h. Veränderungen der Syntheserate betreffen, oder durch die Produktion eines qualitativ veränderten Moleküls gekennzeichnet sein.

Erste systematische Untersuchungen bezogen sich auf die sauren Glykosaminoglykane (frühere Bezeichnung: saure Mucopolysaccharide), eine Gruppenbezeichnung für anionische, linearpolymeren Polysaccharide, die aus charakteristischen Disaccharideinheiten zusammengesetzt sind und an deren Auf-

bau ein Aminosucker beteiligt ist (15,16).

Im Knorpel entsprechen die Disaccharideinheiten der Sequenz GlcUA(1-3) - GalNAc-4(6)-sulfat (1-4) dem Chondroitinsulfat, Disaccharideinheiten der Sequenz Gal(1-4) - GlcNAc-6-sulfat (1-3) dem Keratansulfat (Abb.1).

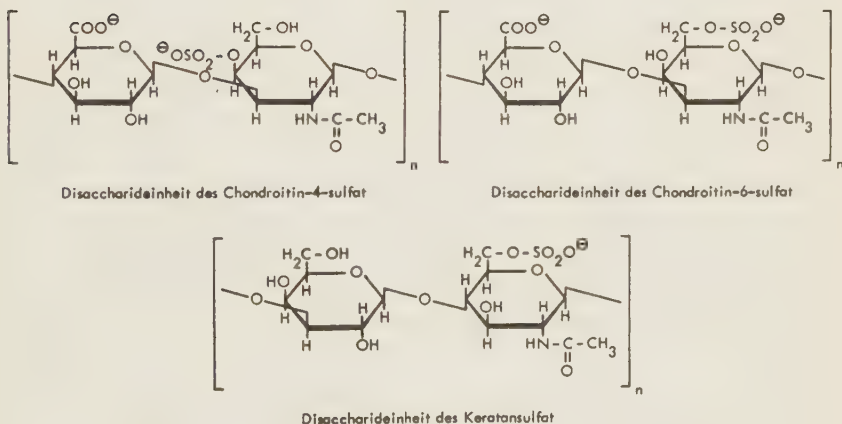


Abb.1

Disaccharideinheiten von Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat. Im Knorpelgewebe sind Chondroitinsulfatketten mit etwa 40 Disaccharideinheiten und Keratansulfatketten mit etwa 15 - 25 Disaccharideinheiten in kovalenter Bindung mit einem Proteinanteil (Proteincore) verknüpft.

Die Summe dieser Glykosaminoglykane nimmt nach Anstieg während der ersten beiden Dezenien im Laufe des Lebens kontinuierlich ab (12,17-22), während es unabhängig von der Gewebekonzentration zu einer Verschiebung im Verteilungsmuster der GAG kommt.

So beschreiben Kaplan und Meyer (23) am menschlichen Rippenknorpel anhand von GlcUA- und HexN-Analysen und Kuhn und Leppelmann (11) am Gelenkknorpel des Femur anhand von GlcNAc- und GalNAc-Analysen eine altersabhängige Reduktion des Gehalts an Chondroitinsulfat und eine Zunahme von Keratansulfat.

Auch in anderen Knorpelgeweben konnte die Abnahme des CS/KS-Quotienten bis zu einem KS-Anteil von etwa 40-50% in hohem Alter nachgewiesen werden (12,21-30).

Das Verhältnis von C-4-S und C-6-S unterliegt bei Abnahme des Gesamt-CS ebenfalls altersabhängigen Einflüssen; im menschlichen Kniegelenkknorpel wurde eine Abnahme von C-4-S beschrieben, während die Sulfatierung am C-Atom 6 relativ bis auf das etwa 7-fache zunimmt (31).

1.4 Altersabhängige Veränderungen der Proteoglykane des Knorpelgewebes

Die sauren Glykosaminoglykane liegen in ihrer nativen Zustandsform im Gewebe nicht als freie Polysaccharide, sondern in kovalenter Bindung an spezifische, nicht mit dem Struktureiweiß Kollagen identische Proteine vor (Proteoglykane). So sind im Knorpelgewebe eine variable Anzahl von CS- bzw. KS-Ketten unterschiedlicher Länge mit einem zentralen Proteincore über eine Oligosaccharidbindungsregion verbunden. Dabei macht der Proteinanteil 10 - 20%, der Glykosaminoglykananteil 80 - 90% aus (32).

In den letzten 10 - 15 Jahren rückten die Proteoglykane immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses.

Sie verdienen besondere Beachtung, weil sie einerseits untereinander in Wechselwirkung treten und zum anderen mit dem 3-dimensionalen Netzwerk der kollagenen Fasern in Interaktion stehen (33-40).

Durch ihre makromolekulare Struktur und Verfilzung und die dadurch gegebenen physikochemischen Eigenschaften regulieren sie den extrazellulären Stofftransport (Funktion eines Molekularsiebs); Proteoglykane können Wasser binden (mechanische Funktion eines Wasserkissens) und, da es sich um Polyanionen handelt, ebenfalls Elektrolyte (Ionenbindungs-, Ionenaustauschfunktion).

Die makromolekulare Organisation der Proteoglykane ist im wesentlichen dadurch charakterisiert, daß einzelne Proteoglykanmoleküle (Proteoglykanuntereinheiten, PG-subunits, PGS) in wässriger Lösung die Fähigkeit besitzen, über ihr Proteincore und einem als "Link-Protein" bezeichneten stabilisierenden Faktor mit Hyaluronat strukturspezifische Aggregate (Proteoglykankomplexe, PGC) zu bilden (41-44,68), (Abb.2).

Elektronenmikroskopische Studien an Rindernasenknorpel veranschaulichen diese Befunde (45,46), (Abb.3).

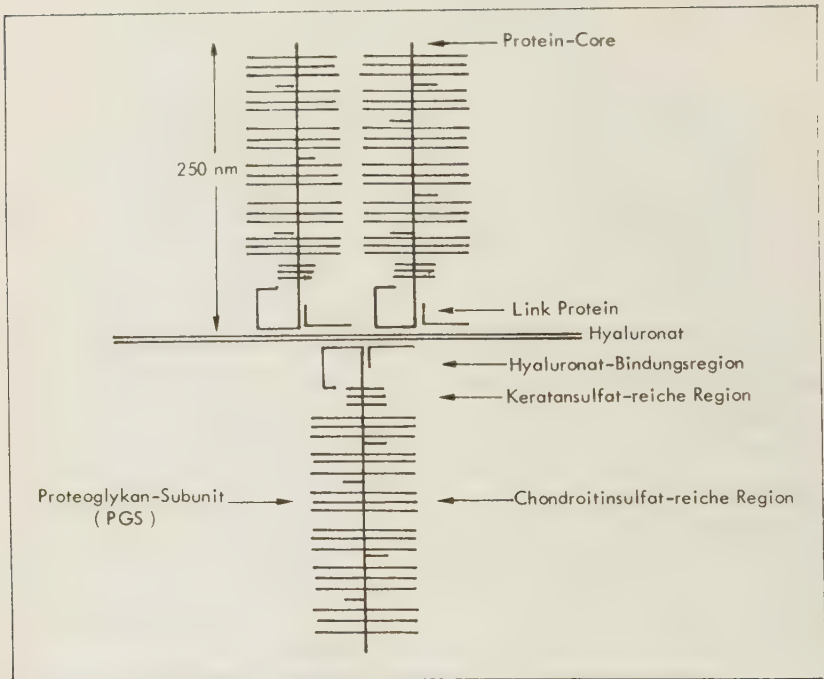


Abb.2

Bauprinzip der makromolekularen Struktur der Proteoglykane. Ein zentrales Protein (Protein-Core) ist mit einer variablen Anzahl von Glykosaminoglykanseitenketten kovalent verknüpft, wobei etwa $\frac{1}{3}$ des Proteins eine globuläre Struktur besitzt, mit der keine oder nur wenige Polysaccharidketten verknüpft sind; diese Region tritt in Wechselwirkung mit Hyaluronat (Hyaluronat-Bindungsregion). An die restlichen Drittel sind vorwiegend Keratansulfatketten (KS-reiche Region) bzw. Chondroitinsulfatketten (CS-reiche Region) gebunden.

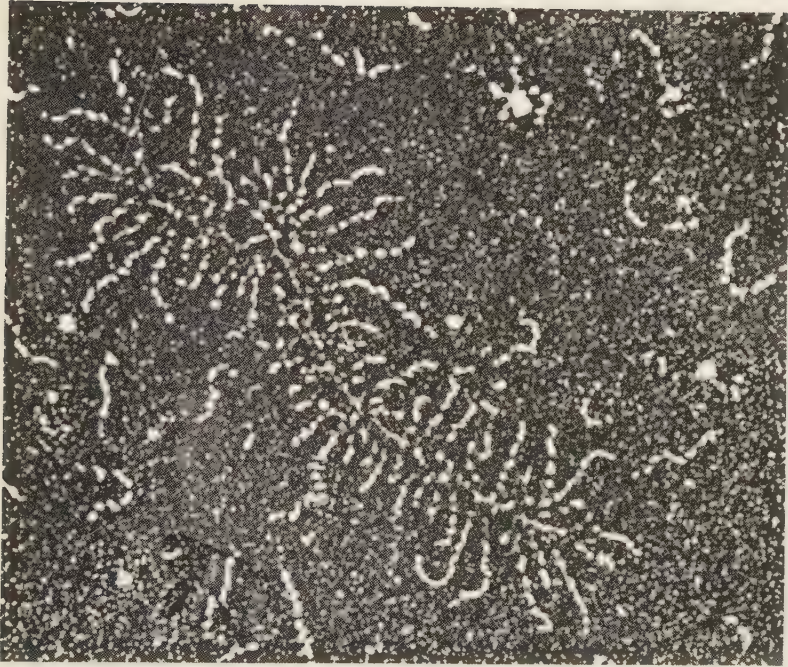


Abb.3

Elektronenoptische Darstellung eines Proteoglykanmoleküls
aus Rindernasenknorpel.

Bei dem von Hascall und Sajdera 1969 beschriebenen Verfahren zur Extraktion von Proteoglykanen unter dissoziativen Bedingungen (47,48) lösen sich 85% der im Gewebe enthaltenen Proteoglykane in hochmolekularen Salzlösungen als Proteoglykansubunits. Diese Basismoleküle und Grundeinheiten der Proteoglykane bilden ihrerseits auch bei In-vitro-Versuchen unter assoziativen Bedingungen (Lösungen geringen Salzgehalts) die beschriebenen Assoziate (PGC).

Alternsabhängige Veränderungen in der Gesamtgewebskonzentration und der Mengenrelation CS/KS der hybriden Chondroitinsulfat-Keratansulfat-Proteoglykane im Knorpelgewebe entsprechen denen der Glykosaminoglykane.

Proteinanalysen zeigen eine relative Zunahme des Eiweißgehalts (49,52).

Weiterhin lassen sich in Abhängigkeit vom Lebensalter gesetzmäßige Veränderungen im Molekulargewicht und anderen physikochemischen Kenngrößen der Proteoglykane angeben. So nimmt das Molekulargewicht des Chondroitinsulfat-Keratansulfat-Proteoglykans bis zum 20. Lebensjahr zu (höchster Wert: $2,4 - 3,8 \times 10^6$), um dann bis ins hohe Alter kontinuierlich abzufallen (50). Entsprechend verhält sich das Wasserbindungsvermögen (effektives hydrodynamisches Volumen) (51). Weiterhin ist ein Abfall der CS/KS-Kettenlänge und -zahl zu verzeichnen. Der Durchmesser des PG-Moleküls (Knäuel) geht von 780 Å in der Altersklasse 21 - 27 Jahre auf 540 Å (54 - 59 J.) zurück (50).

Eine alternsabhängig zunehmende Molekulardispersität und chemische Heterogenität der Proteoglykansubunits konnte 1975 im Rippenknorpel gezeigt werden.

Durch Gelchromatographie lies sich nachweisen, daß mit zunehmendem Alter Proteoglykanfraktionen niederen Molekulargewichts auftreten, die durch einen hohen KS-Anteil gekennzeichnet sind (49).

Heinegard beschrieb 1977 eine unabhängig vom Lebensalter bestehende Polydispersität von Knorpel-Proteoglykanen,

indem er durch dissoziative Dichtsgradientenzentrifugation und Analysen in den Subfraktionen strukturelle Veränderungen der PG in Abhängigkeit von Molekülgröße bzw. Molekulargewicht zeigte (52).

1.5 Stoffwechsel der Glykosaminoglykane in Abhängigkeit vom Lebensalter

Aussagen über die Stoffwechselaktivität eines Gewebes lassen sich durch Isotopenexperimente gewinnen. Sie basieren auf dem Prinzip, daß das zu untersuchende Gewebe in Gegenwart von ^{14}C -, ^3H - oder ^{35}S -markierten Stoffwechsellvorstufen ("Präkursoren") inkubiert wird und die während der Inkubation durch den Stoffwechsel des Gewebes erhaltenen radioaktiv markierten Syntheseprodukte aus dem Gewebe isoliert und biochemisch charakterisiert werden.

Für die Untersuchung des Knorpelgewebes hat sich die Verwendung von ^{35}S -Sulfat als vorteilhaft erwiesen. ^{35}S -Sulfat wird während der Synthese der Glykosaminoglykane des Knorpelgewebes als Estersulfat in Chondroitinsulfat und Keratansulfat eingebaut. Voruntersuchungen haben gezeigt, daß die Estersulfatgruppe des Chondroitinsulfat bzw. Keratansulfat repräsentativ für den Stoffwechsel des Gesamtmoleküls ist. Dies wird durch die Tatsache belegt, daß bei Parallelexperimenten unter Verwendung von ^{14}C -Glucose, ^{14}C -Acetat und ^{35}S -Sulfat gleiche biologische Halbwertszeiten für die markierten sauren Glykosaminoglykane erhalten wurden (53,54).

Die alternansabhängigen Veränderungen der ^{35}S -Sulfat-Inkorporation zeigen im Processus xiphoideus und Rippenknorpel von Ratten einen deutlichen, der algebraischen Kurve $xy - 1 = 0$ entsprechenden, Abfall (Abb.4).

Auch im menschlichen Knorpelgewebe nimmt die In-vitro-Syntheserate für die Gesamt-Glykosaminoglykane vom 2. Lebensjahr bis ins hohe Alter ab. Untersuchungen des CS- und KS-Gehalts im menschlichen Rippenknorpel zeigten, daß die Ab-

nahme der Gesamt-Glykosaminoglykan-Syntheserate im wesentlichen auf einen mit dem Alter verminderten $^{35}\text{SO}_4$ -Einbau in CS zurückgeht, während der Sulfat-Einbau in KS etwa viermal geringer ist und in allen Altersgruppen etwa konstant bleibt (29).

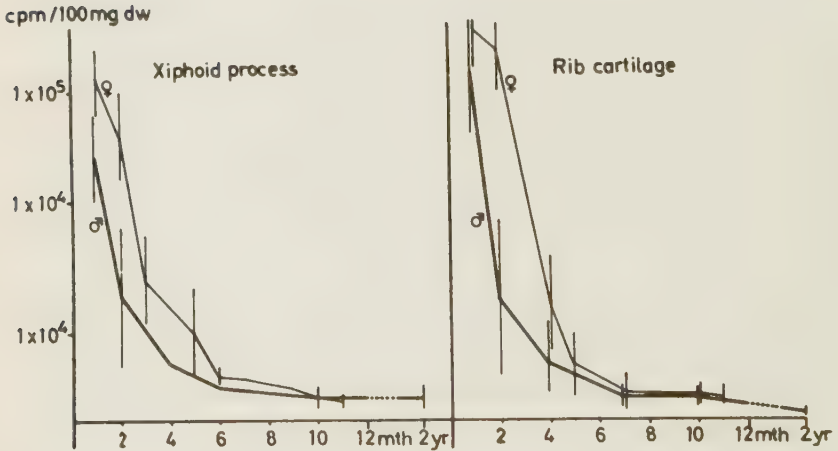


Abb.4

Altersabhängiger Abfall der ^{35}S -Sulfatinkorporation in die sulfatierten Glykosaminoglykane des Processus xiphoideus bzw. des Rippenknorpels von Ratten. Angabe in cpm/100 mg Gewebstrockengewicht (55).

2.0 Problemstellung

Die bisherigen Untersuchungen über die altersabhängigen Veränderungen menschlichen Knorpelgewebes geben zwar Auskunft über den Einbau von ^{35}S -Sulfat in Chondroitinsulfat und Keratansulfat und die mit zunehmendem Alter auftretenden Veränderungen der Einbauraten, lassen jedoch die Verteilung der Radioaktivität auf die Proteoglykanmoleküle unterschiedlichen Molekulargewichts unberücksichtigt. Nach Kenntnis der Molekulardispersität der Proteoglykane des Knorpelgewebes sind solche Untersuchungen jedoch zu fordern.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Aussagen über die Syntheserate der Proteoglykane unterschiedlicher Molekülgröße in Abhängigkeit vom Lebensalter zu gewinnen. Dazu waren ^{35}S -Inkorporation und spezifische Radioaktivität der in diesen Proteoglykanfraktionen vorhandenen individuellen Glykosaminoglykane, Chondroitinsulfat und Keratansulfat, zu ermitteln.

Die Versuche wurden so angelegt, daß aus einer größeren Anzahl von Proben aus menschlichem Knorpel (Processus xiphoideus) verschiedenen Lebensalters nach Vorinkubation unter in vitro-Bedingungen in Gegenwart von ^{35}S -Sulfat die Proteoglykane extrahiert und zunächst die analytischen Basisdaten der Proteoglykane sowie die Inkorporation von ^{35}S -Sulfat in die sulfatierten Proteoglykane ermittelt wurden. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Einzelproben in 6 Altersklassen (I - VI) geordnet (4.1).

Die erhaltenen Proteoglykane wurden anschließend durch gel-chromatographische Trennung unter dissoziativen Bedingungen in verschiedene Proteoglykanfraktionen mit definierten Molekulargewichtsbereichen (a,b,c) getrennt. Durch chemische Analysen und Radioaktivitätsmessungen der Einzelfraktionen wurden die altersspezifischen Veränderungen der Proteoglykanunterfraktionen a, b, c ermittelt (4.2, 4.3).

Für die weitere Charakterisierung der Proteoglykanfraktionen a - c wurde eine Darstellung in präparativem Maßstab vorgenommen. Sie erlaubte eine bessere Quantifizierung und diente der Analyse des Proteingehaltes der Proteoglykanfraktionen a - c (4.4).

Zur Prüfung der Frage, welchen Veränderungen die spezifische Radioaktivität und die Syntheserate des Chondroitinsulfats und Keratansulfats im Laufe des Alterns in den verschiedenen Molekulargewichtsbereichen unterliegen (4.6), wurden aus jeder der präparativ gewonnenen Proteoglykanunterfraktionen a und b Chondroitinsulfat und Keratansulfat isoliert und auf ihre chemische Analyse und Radioaktivität hin untersucht (4.5).

3.0 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsgut

Als Untersuchungsmaterial dienten die knorpeligen Anteile vom menschlichen Processus xiphoideus (ensiformis). Die Wahl dieses einheitlichen, klar definierten Knorpelstücks ist eine wichtige Voraussetzung für vergleichbare altersbezogene Ergebnisse. Im Gegensatz dazu kann z.B. beim Rippenknorpel allein die Wahl unterschiedlicher Anteile (medial, lateral) auf Grund der bei Ratten festgestellten Zunahme des Molekulargewichts und der Stoffwechselintensität der enthaltenen Proteoglykane bzw. Glykosaminoglykane vom Sternum zur Knorpel-Knochengrenze hin (56) zu abweichenden Ergebnissen führen. Das Material wurde während der Sektion im pathologischen Institut bzw. im gerichtsmedizinischen Institut Münster entnommen, sofort gekühlt und in der unter 3.3 beschriebenen Weise weiterbehandelt.

3.2 Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Knorpelgewebes

Das Prinzip der Untersuchungen bestand in einer Inkubation des Knorpelgewebes in Gegenwart von ^{35}S -Sulfat zur spezifischen Markierung der Proteoglykane bzw. Glykosaminoglykane, Extraktion der ^{35}S -Proteoglykane, ihre Trennung durch Gel-filtration in Proteoglykanfraktionen unterschiedlicher Molekulargewichtsbereiche und Charakterisierung der Proteoglykanfraktion bezüglich chemischer Zusammensetzung und spezifischer Radioaktivität.

Die Abb.5 und 6 geben die Aufarbeitung in schematischer Form wieder.

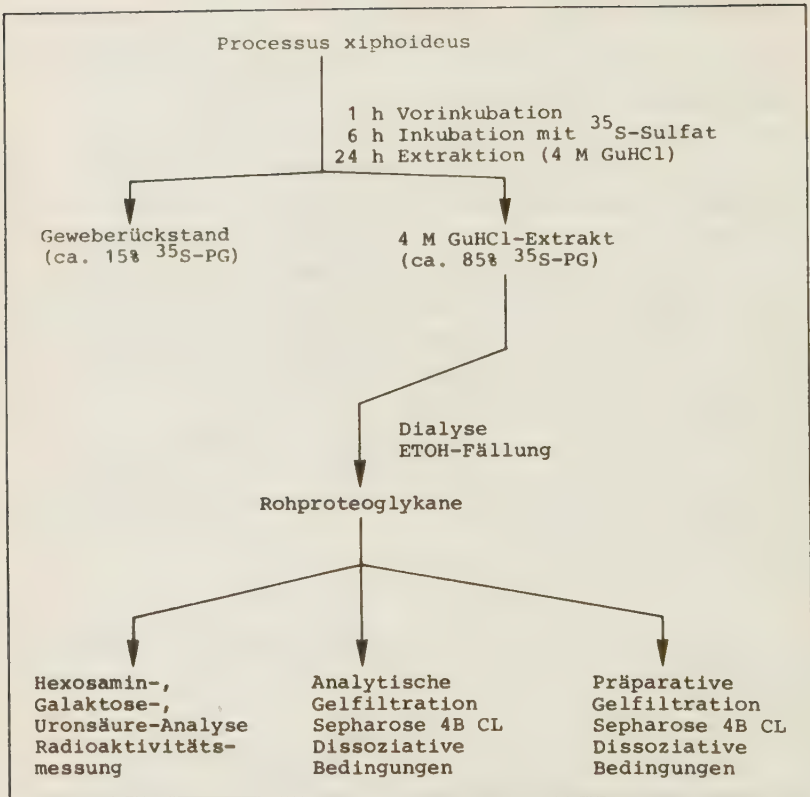


Abb.5

Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Processus xiphoideus (menschliches Untersuchungsgut) zur spezifischen Markierung, Extraktion und Darstellung der Proteoglykane.

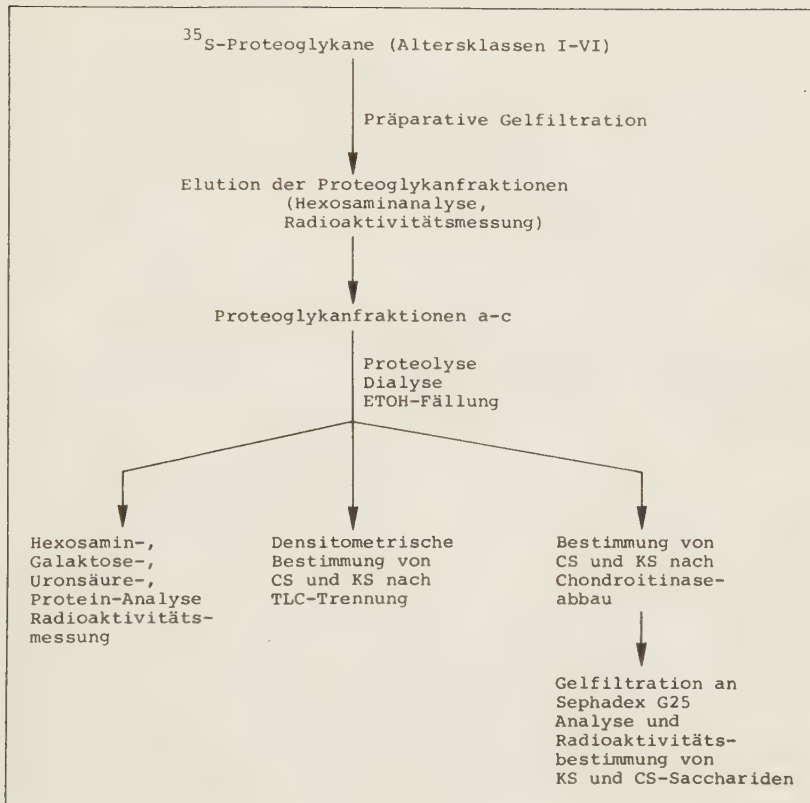


Abb.6

Schematische Darstellung der präparativen Trennung ³⁵S-markierter Proteoglykane der Altersklassen I - VI an Sepharose 4B unter dissoziativen Bedingungen und der Analyse der Proteoglykanunterfraktionen a - c.

3.3 In vitro Inkubation des Knorpelgewebes in Gegenwart von ^{35}S -Sulfat

Das Sektionsgut muß zunächst von Fettgewebe, Muskelteilen und Perichondrium freipräpariert werden. Die knorpeligen Anteile des Processus xiphoideus werden mit einem Skalpell in feine, etwa 200 - 300 μm dicke Schnitte zerlegt und nach Gewichtsbestimmung in 20 ml 1%-iger Glucose-Krebs-Ringer-Lösung¹ 1 Stunde vorinkubiert.

Alle Ansätze werden in der Warburgapparatur bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 90/Min. unter Einleiten von Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) und Zusatz von 50 μl einer 10%-igen Ampicillinlösung zur Verhinderung mikrobiellen Wachstums inkubiert.

Nach Vorinkubation und damit Reaktivierung des Stoffwechsels in den Knorpelschnitten wird die Vorinkubationslösung verworfen, die Knorpelscheiben werden gründlich mit Pufferlösung abgespült.

Während der Hauptinkubation in 10 ml Pufferlösung pro g Frischgewicht erfolgt die isotopische Markierung der Inhaltsstoffe mit radioaktivem Schwefel in der Sulfatgruppe. Die Hauptinkubation dauert 6 Stunden; sie wird durch Spülen mit 200 ml eiskalter physiologischer Kochsalzlösung beendet.

¹Krebs-Ringer-Lösung:

- 80,0 ml 0,9 % NaCl-Lösung
- 2,5 ml 0,155 M KCl-Lösung
- 2,0 ml 0,11 M CaCl_2 -Lösung
- 20,0 ml 0,155 M NaHCO_3 -Lösung

3.4 Isolierung und Fraktionierung der Proteoglykane und Glykosaminoglykane

3.4.1 Extraktion und Äthanol-fällung

Die Extraktion wird nach der von Hascall und Sajdera 1969 beschriebenen Methode, eine Extraktion von Proteoglykanen unter dissoziativen Bedingungen, durchgeführt (52,53). Nach Inkorporation des Schwefelisotops erfolgt also die Extraktion in 4 M GuHCl-Lösung (10 ml/g FG) mit Zusatz von Inhibitor-Lösung¹ zur Verhinderung proteolytischer Prozesse.

Die Extraktionsdauer wird auf 24 Stunden festgelegt, Temperatur 4°C. Während des Vorgangs wird wiederholt umgerührt, wobei das Umrühren zur Vermeidung mechanischer Gewebeschädigung vorsichtig erfolgen muß.
Der Extraktionsrückstand bleibt unberücksichtigt.

Um gelöste Proteoglykane bzw. Glykosaminoglykane als Trockensubstanz zu erhalten, wird das 2 1/2-fache Volumen einer 1%-igen K-acetat-Äthanol-Lösung (1% bezogen auf Gesamtvolumen) unter ständigem Umrühren langsam zugesetzt. Die gefällte Substanz wird, nachdem der Überstand völlig klar ist, dreimal mit Äthanol, zweimal mit peroxidfreiem Äther gewaschen und getrocknet.

¹Inhibitor-Lösung (Cocktail):

ε-Amino-Capronsäure	0,1	M
EDTA	0,01	M
Benzamidiniumchlorid	0,001	M

3.4.2 Gelfiltration auf Sepharose 4B Cl

Das Verfahren der Gelfiltration wird benutzt zur Trennung von Stoffen nach ihrer Molekülgröße und ermöglicht eine Abschätzung des Molekulargewichts.

Dabei sind gleichmäßige, gasfreie Sedimentation der Gelpartikel in der verwendeten Glassäule, Stabilisieren und Äquilubrieren des Gelbetts, konstanter zulässiger Arbeitsdruck (Unterschied zwischen freier Oberfläche des Elutionsmittels im Reservoir und Säulenausfluß), Überprüfen der Homogenität und Eichung der Säule durch Bestimmen von V_0 mit einer Dextranblaulösung und von V_t wichtige Voraussetzungen.

$$\text{Kalkulation des MG nach } k_{av} = \log \text{ MG} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Für die analytische Trennung der extrahierten Proteoglykan-subunits (vgl. 3.4.1) werden, weiterhin unter dissoziativen Bedingungen (4 M GuHCl in 50 mM Na-acet., pH 5,8), 10 mg Rohproteoglykan von jeder Aufarbeitung in 0,4 ml gelöst und auf Sepharose 4B Cl in einer Glassäule von 1m x 1,1cm aufgetragen.

Die Bezeichnung CL (cross linked) weist auf eine spezielle Vernetzung hin, die eine partielle Degradation der Polymere durch 4 M GuHCl-Lösung ausschließt und wiederholte Verwendung der Säulenfüllung bei gleichen Trenneigenschaften ermöglicht.

Arbeitsdruck : 60 cm Wassersäule

Fließrate : 11,2 ml/h

$V_0 = 38 \text{ ml}$, $V_t = 90 \text{ ml}$

Fraktionsvol. : 2,0 ml

Vom Fraktionsvolumen werden nach Dialyse 0,9 ml für Hex N - und Gal-, 0,5 ml für GlcUA-Analysen und 0,2 ml für die Radioaktivitätsmessung eingesetzt.

Die Volumenänderung auf Grund der Dialyse wird berücksichtigt.

Für die präparative Trennung werden in jeder Altersklasse 150 mg eingesetzt.

Elutionsmittel : 4 M GuHCl in 50 mM Na-acet., pH 5,8
Säulenmaße : 1,25 m x 3,0 cm
Arbeitsdruck : 65 cm Wassersäule
Fließrate : 32 ml/h
 $V_0 = 300$ ml, $V_t = 840$ ml
Fraktionsvol. : 10,0 ml

3.4.3 Gelfiltration auf Sephadex G 25

10 mg eines CS/KS-Gemisches bzw. 0,95 ml Lösung werden nach CS-Abbau mit Chondroitinase AC (vgl. 3.5.8) zum Ausschluß von KS auf eine mit Sephadex G 25 gefüllte Säule aufgetragen.

Elutionsmittel : 1 M NaCl-Lösung
Säulenmaße : 2,40 m x 1 cm
Arbeitsdruck : 190 cm Wassersäule
Fließrate : 7,2 ml/h
 $V_0 = 72,8$ ml, $V_t = 186$ ml
Fraktionsvol. : 2,8 ml

Von den Fraktionen werden 0,5 ml zur Radioaktivitätsmessung eingesetzt (weiteres 4.6).

3.5 Analysen

3.5.1 Vorbereitung der Proben zur quantitativen Bestimmung von Hexosamin und Galactose

Alle Analysen werden entweder nach Gelfiltration in den einzelnen Fraktionen nach Entfernen des Elutionsmittels durch Dialyse durchgeführt oder nach Aufnahme einer durch Alkohol-fällung bzw. Gefriertrocknung erhaltenen Trockensubstanz in Aqua dest..

Bevor die Methoden zur Bestimmung von Hexosaminen und Galactose beschrieben werden, müssen genaue Informationen über die für beide Bestimmungsarten gleiche Aufarbeitung gegeben werden; Abb. 7 gibt eine Übersicht.

Ziel der Aufarbeitung ist es, die Proben zu konzentrieren und damit die Nachweisgrenzen herabzusetzen, die Inhaltsstoffe (Hexosamine und Galactose) möglichst quantitativ durch Hydrolyse freizusetzen und die Salzkonzentration gering zu halten.

0,9 ml der dialysierten Probe werden ins Eppendorfgeläß pipettiert und im Vakuum bei 50°C im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Aufnahme der Trockensubstanz zur Hydrolyse erfolgt in 0,25 ml 2 N Schwefelsäurelösung.

Wichtig bei der Hydrolyse mit nachfolgender Galactosebestimmung ist, die Bildung von N-haltigen Pigmenten (= Melanoidine), die immer dann auftreten, wenn reduzierende Zucker und Aminogruppen enthaltende Verbindungen (Aminosäuren, Eiweiße, Proteoglykane) nebeneinander vorkommen, weitgehend zu verhindern. Es zeigte sich deutlich, daß diese nicht enzymatische Bräunungsreaktion, auch Maillardreaktion genannt, in 2 N H₂SO₄-Lösung schwächer ablief als in entsprechend starker HCl-Lösung.

Bräunungsinhibitoren wie Dimedon und Sulfit, ein in der

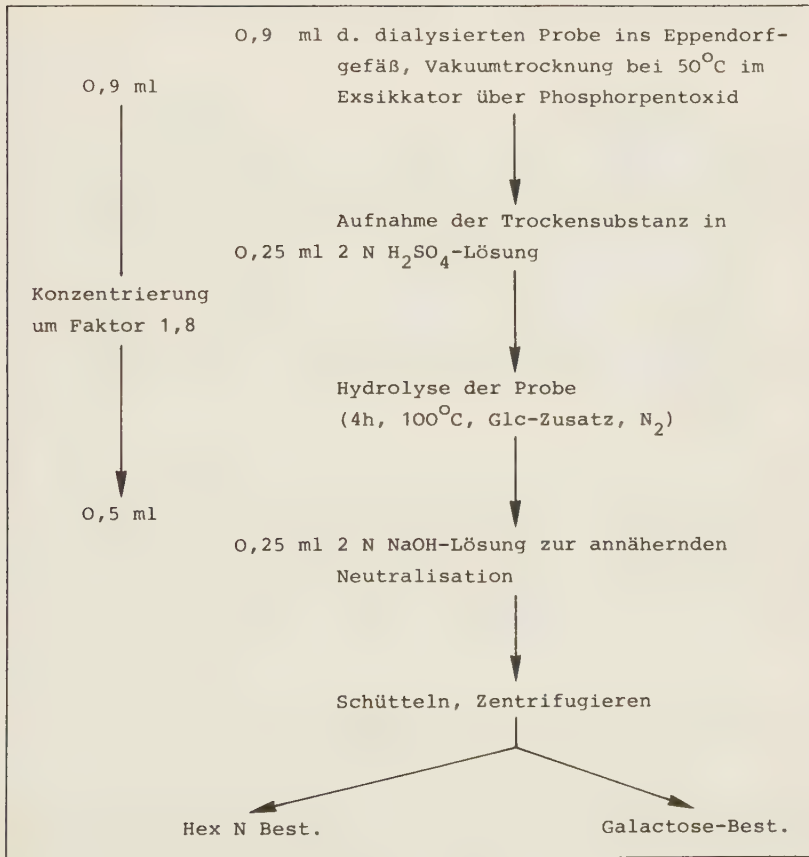


Abb.7

Schematische Darstellung der quantitativen Bestimmung von Aminosuckern und Galactose in Proteoglykanen bzw. Glykosaminoglykanen.

Lebensmittelchemie eingesetzter Hilfsstoff bei leicht bräunenden Lebensmitteln, erbrachten unter vorliegenden Bedingungen keine Bleichwirkung bzw. höhere Galactoseausbeute.

Die Hydrolyse erfolgte in sauerstofffreien Gefäßen (unter N_2) 4 Stunden bei $100^{\circ}C$.

Etwas Glucose diente dazu, kompetitiv zur Galactose in die schon weitgehend reduzierte Bräunungsreaktion einzugehen.

Nach der Hydrolyse wird mit 0,25 ml 2 N NaOH-Lösung annähernd neutralisiert, geschüttelt und zentrifugiert.

Die Probe kann jetzt den nachfolgend beschriebenen Methoden zur Bestimmung der enthaltenen Hexosamine und Galactose zugeführt werden.

Als sehr praktisch für die Hex N-Bestimmung und für die beschriebene Aufarbeitung erwies sich der von H.M.Van de Loo beschriebene Ständer (Abb.8) (57). Er erlaubt es, gleichzeitig insgesamt 50 Proben in Eppendorfgefäßen bestimmten Bedingungen zu unterwerfen.

3.5.2 Quantitative Hexosaminbestimmung

Die in 3.5.1 beschriebene Vorbereitung zur quantitativen Hex N- und Gal-Bestimmung sowie die Ausführungsbestimmungen für die Hex N-Analyse berücksichtigen, daß geringste PG-mengen zur Analyse zur Verfügung stehen und stellen eine weiter verbesserte Methode der Van de Loo'schen Modifikation der Elson-Morgan-Reaktion dar.

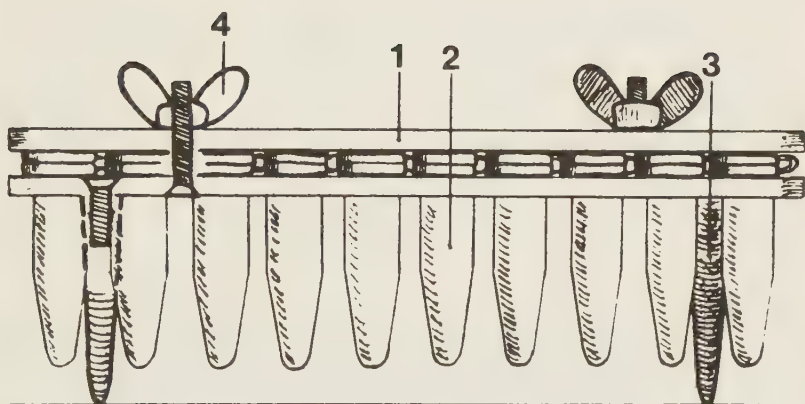


Abb. 8

Haltevorrichtung für Reaktionsgefäße zur Hexosaminbestimmung
(seitliche Ansicht).

1 = Deckel, 2 = Reaktionsgefäß (Eppendorfggefäß), 3 = Fuß,
4 = Flügelschraube.

Reagenzien:

I. Acetylacetonreagenz

0,15 ml Acetylaceton gelöst in

5,0 ml frisch zubereiteter 1 N Na_2CO_3 -Lösung

II. Ehrlichs Reagenz

p-Dimethylaminobenzaldehyde gelöst in

60,0 ml konz. HCl-Lösg. und 96% ETOH (1:1)

Ausführung:

0,1 ml der Probe wird ins Eppendorfgeläß gegeben und neutralisiert, wobei die Titration vorsichtig mit einer μl -Pipette gegen Phenolphthalein erfolgt. Ein Leerwert mit 0,1 ml H_2O wird mitgeführt.

0,1 ml Acetylacetonreagenz wird zugegeben, der Ansatz geschüttelt und sofort bei 90°C im Wasserbad erhitzt. Nach genau 45 Min. werden die Proben in Eiswasser abgekühlt und mit 1,0 ml ETOH und 0,1 ml Ehrlichs Reagenz versetzt. Die Ansätze werden geschüttelt und kurz zentrifugiert. Die Extinktionsmessung muß nach genau 20 Min. bei 530 nm erfolgen.

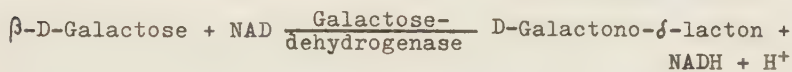
Durch die Hydrolyse, die besonders wegen der Galactosebestimmung sehr schonend ablaufen muß (s. 3.5.1), ergibt sich anhand einer KS-Verdünnungsreihe incl. 20% Protein eine konstante Ausbeute von 43,1%.

Der Extinktionswert muß also auf Grund der Konzentrierung um 1,8 und der Ausbeute mit 1,289 multipliziert werden.

3.5.3 Enzymatische Galactosebestimmung

Die Galactosebestimmung wurde mit Galactosedehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* durchgeführt. Dieses Enzym besitzt im Vergleich zur Galactoseoxidase eine sehr große Spezifität (58) und ein flaches pH-Optimum zwischen pH 7,5 und 10,0.

Die Reaktion läuft nach folgender Gleichung:



Als Reduktionsäquivalent dient NAD. Die Menge an gebildetem NADH, gemessen als Extinktionsdifferenz bei 340 nm, ist der D-Galactosemenge proportional.

Reagenzien:

- I. Tris-Puffer (0,5 M, pH 8,6)
- II. NAD-Lösung (10 mg NAD/ml H₂O)
- III. Enzymkonz. (1mg/ml, ca. 5U/ml)

Bei der für Tris-Puffer gewählten Stärke (0,5 M!) liegt der pH-Wert der nicht neutralen Probe in jedem Fall im Bereich der Pufferkapazität (pH 8,6), für die Aktivität des Enzyms von außerordentlicher Wichtigkeit.

Enzymansatz:	Leerwert:
0,5 ml Tris-Puffer	0,5 ml Tris-Puffer
0,1 ml Probe	0,1 ml Probe
0,1 ml NAD	0,1 ml NAD
0,05 ml Enzym	

β -D-Galactose liegt in einem isomeren Gleichgewicht vor. Die Reaktionszeit muß deshalb mit 1 Std. festgelegt werden, um sicher sein zu können, daß die gesamte D-Galactose umgesetzt ist. Die Enzymeinwirkung erfolgt bei 25°C.

Berechnung:
$$c = \Delta E \times \frac{V}{\epsilon \times d \times v}$$
$$\Delta E \times \frac{0,75}{0,622}$$
$$\Delta E \times 1,206$$

c = Konzentration ($\mu\text{Mol/ml}$)

V = Ansatzvolumen (ml)

ϵ = Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$)

d = Lichtweg bzw. Schichtdicke (cm)

v = Probevolumen im Ansatz (ml)

Durch die schonende Hydrolyse (siehe Aufarbeitung) ergibt sich eine konstante Ausbeute von 37,5% (ermittelt an einer KS-Verdünnungsreihe incl. 20% Protein). Da die Probe während der Aufarbeitung um den Faktor 1,8 konzentriert wird, muß ΔE mit 1,786 multipliziert werden.

Empfindlichkeitsbereich: 0,05 $\mu\text{Mol/ml}$ - 2,335 $\mu\text{Mol/ml}$
(entspr. Extinktionen: 0,028 - 1,307)

3.5.4 Quantitative Uronsäurebestimmung

Die Uronsäurewerte werden nach der von Bitter und Muir 1962 beschriebenen Boratmethode mit Carbazol bestimmt (59).

Reagenzien:

- I. 0,025 M Dinatrium-Tetraborat in konz. H_2SO_4 -Lösg.
(5,2 g Na-Tetraborat + 167 ml H_2O + 1000ml
konz. H_2SO_4 -Lösg.)

- II. 0,1% Carbazol in Äthanol

Ausführung:

0,5 ml der zu untersuchenden Probe werden im Eisbad mit 3,0 ml Tetraborat- H_2SO_4 -Lösung versetzt und sorgfältig

gemischt. Nach 10 Min. Kochen und Abkühlen im Eiswasser werden 0,1 ml Carbazollösung hinzugegeben, sorgfältig gemischt und weitere 10 Min. gekocht.

Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird die Extinktion bei 520 nm abgelesen.

Leerwert: Wasser

Standard: 1 μ Mol Uronsäure/ml

3.5.5 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung von Proteinen erfolgt nach Lowry (60).

Reagenzien:

I. 20 g Na_2CO_3 , 4 g NaOH und 0,2 g K-Na-tartrat
in 1000 ml H_2O lösen

II. 5 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml H_2O lösen

III. Folinreagenz, Merck 9001, 1:3 mit H_2O verdünnen

Ausführung:

Vor Gebrauch werden 50 ml Lösung I und 1 ml Lösung II gemischt. Von dieser Testlösung gibt man 1 ml zu 100 μ l proteinhaltiger Analysenlösung. Nach zehn Minuten gibt man 100 μ l Folinreagenz (1:3) dazu und mischt innerhalb der ersten zwei Sekunden. Nach 30 Minuten wird die Extinktion bei 750 nm bestimmt.

Leerwert: H_2O

Standard: Eichkurve mit 50 - 1000 μ g Protein/ml
(Rinderserumalbumin)

3.5.6 Radioaktivitätsmessungen

Für den Nachweis der nach Markierung mit ^{35}S -Sulfat in Proteoglykanen bzw. Glykosaminoglykanen ausgesendeten Korpuskularstrahlung (β -Strahlen) diente ein Flüssigkeitsscintillationszähler der Firma Packard.

0,1 ml einer Lösung von 1 mg PG bzw. GAG in 1,0 ml Aqua dest., 0,2 ml der nach Gelfiltration auf Sepharose 4B CL und 0,5 ml der nach Gelfiltration auf Sephadex G 25 anfallenden Fraktionen werden in Zinsser-Polyäthylen-Zählfläschchen mit 2,0 ml bzw. 5,0 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve) versetzt.

Die ermittelte Zählzahl, darunter versteht man die ausgelösten Zählimpulse pro Zeit (cpm), ist proportional zur Aktivität des verwendeten Radionuklids.

Bei wiederholten bzw. vergleichenden Radioaktivitätsmessungen ist die Halbwertszeit von ^{35}S (80 Tage) berücksichtigt worden; alle Werte sind auf 50 oder 100 auf- bzw. abgerundet.

3.5.7 Densitometrische Bestimmung des Chondroitinsulfat/ Keratansulfatverhältnisses

3.5.7.1 Proteolytischer Aufschluß

Um weitere Aussagen über CS und KS in Proteoglykanen machen zu können (Mengenrelation, Radioaktivitätseinbauraten in CS und KS), müssen zunächst die enthaltenen Proteine abgebaut werden. Die Proteolyse erfolgt mit Papain in einem Puffer-

gemisch¹ (2 ml/10 mg PG) 72 Stunden bei 60°C unter erneuter Zugabe von Papain nach 24 und 48 Std..

Nach Dialyse (48 h), Ultrazentrifugation (30 Min.), ETOH-Fällung der im Überstand vorhandenen, sauren GAG und Wiederaufnahme in aqua dest. (2 mg/ml) werden die Bestandteile zur densitometrischen Auswertung dünnschichtchromatographisch getrennt.

3.5.7.2 Dünnschichtchromatographie

Dazu werden 3 µl der Referenzlösungen (KS,C-4-S,C-6-S je 1,2 mg/ml) und entsprechende Mengen der Proben (nach Hex N-Analysen) auf Cellulose-Glasplatten von Merck, Startlinie 2 cm vom unteren Rand, aufgetragen. Bei der Entwicklung mit Äthanol-Ca-acetat-Lösung bei 4°C (wurde in einem Vorversuch als optimale Temperatur ermittelt) wird in Stufen nach folgender Übersicht vorgegangen:

I.	bis 4 cm v.d.Auftraglinie	- 60% Äthanol, 2,5% CaAc	
II.	6 cm	- 50%	, 5,0%
III.	8 cm	- 40%	, 5,0%
IV.	10 cm	- 30%	, 5,0%
V.	12 cm	- 20%	, 5,0%

Das Sichtbarmachen der Substanzflecken erfolgt mit Gentianaviolett, wobei CS und KS in gleichem Verhältnis den Farbstoff binden (61), eine wichtige Voraussetzung für die densitometrische Auswertung; das Cellulosepulver wird mit Methanol-Eisessig-H₂O-Lösung (5:1:4) entfärbt.

¹ 13,609 g NaAc x H ₂ O	= 0,1 M
1,861 g Komplexon, Dinatriumsalz(Titriplex)	= 0,005 M
0,878 g Cysteinhydrochlorid x H ₂ O	= 0,005 M
5 g Papain (Merck, 60.000 E/g)	= 0,5%

3.5.7.3 Densitometrie

Die quantitative Auswertung der Substanzflecken wird an Photonegativen von den Chromatogrammen durchgeführt. Dazu dient das Densitometer IL Bioskamp 377, das die unterschiedlichen Filmschwärzungen entsprechend der Farbdichte der Substanzflecken in einer Spaltbreite von 1 mm abtastet und gleichzeitig die Ergebnisse in Form einer Extinktionskurve mit integraler Auswertung registriert.

Das Verfahren der Densitometrie soll in der vorliegenden Arbeit neben anderen Verfahren die Frage nach dem prozentualen Anteil von CS und KS in Proteoglykanaggregationen bestimmter MG-bereiche beantworten (vgl. 4.5).

3.5.8 Darstellung von Keratansulfat durch enzymatischen Abbau mit Chondroitinase AC

10 mg des nach Proteolyse mit ETOH gefällten Materials (vgl. 3.5.7.1) werden für den enzymatischen Abbau von CS eingesetzt.

Die Substanz wird in 0,75 ml Pufferlösung¹ gelöst, und 0,2 ml einer Chondroitinase AC-Lösung (5U/ml, Arthrobacter aureus) zugesetzt; die Inkubation bei 37°C dauert 24 Std..

Das Enzym, das in vorliegenden Inhaltsstoffen C-4-S und C-6-S abbaut, wurde 1974 in Japan aus Arthrobacter aureus isoliert (62).

KS wird durch Gelfiltration auf Sephadex G 25 dargestellt (vgl. 3.4.3).

¹ Pufferlösung:

100 ml	0,13 N HCl-Lösung
3 g	Tris
2,4 g	NaAc (wasserfrei)
1,48 g	NaCl
50 mg	BSA
0,1%	NaN ₃

pH: 8,0

vor Gebrauch Puffer
1:5 verdünnen

4.0 Ergebnisse

4.1 Chemische Zusammensetzung und spezifische Radioaktivität der aus dem Knorpelgewebe extrahierbaren Proteoglykane

Die Untersuchungen über die Biosynthese und chemische Zusammensetzung der Proteoglykane des Processus xiphoideus wurden an insgesamt 26 Proben durchgeführt, die einem Obduktionsgut der Altersklassen 0,07 - 81 Jahre beiderlei Geschlechts entstammten. Eine Übersicht gibt die Tabelle 1.

Nach Inkubation des Knorpelgewebes in Gegenwart von ^{35}S -Sulfat wurden die Proteoglykane unter dissoziativen Bedingungen extrahiert und durch Äthanol-fällung eine Proteoglykanrohfraktion gewonnen. Die Ergebnisse der Analyse des Hexosamin-, Glucuronsäure- und Galactosegehaltes sowie der Radioaktivität der Proteoglykanfraktion sind in Tabelle 1 bzw. in Abb.9 enthalten.

Es ist erkennbar, daß die Gewebekonzentration der Proteoglykane - gemessen an der extrahierbaren Gesamtmenge der Proteoglykane - während der ersten beiden Lebensdezennien die höchsten Werte aufweist und mit zunehmendem Alter - von individuellen Ausnahmen abgesehen - eine abnehmende Tendenz zeigt.

Alternsabhängige Veränderungen sind auch in der analytischen Zusammensetzung von Proteoglykanen erkennbar; so steigen Hexosamin- und Galactosegehalt von der Geburt bis zum 20.- 30. Lebensjahr an, um dann mit Schwankungen konstant zu bleiben, während der Glucuronsäuregehalt im gleichen Zeitraum zunächst absteigende Tendenz aufweist.

Die größte Variabilität wird beim Einbau von ^{35}S -Sulfat in die Proteoglykane beobachtet. Die Schwankungen der Einzelwerte sind beträchtlich. Bei der Interpretation dieser Werte

Tab.1

Altersabhängige Konzentrationsveränderungen und chemische Analyse der Gesamtproteoglykane im Processus xiphoideus nach in vitro Inkubation des Gewebes in Gegenwart von ^{35}S -Sulfat. Als Gesamtproteoglykane werden die mit 4 M GuHCl extrahierbaren Proteoglykane bezeichnet.

Alters- klasse	Nr.	Alter (Jahre)	Gesamt-PG			GlcUA	HexN	Gal
			m w	mg/g FG	cpm/mg PG $\times 10^{-3}$			
I	1	0,07	m	44,3	137.400	0,731	0,880	0,159
	2	0,11	w	44,8	92.300	0,751	1,027	0,324
	3	1	m	38,2	10.000	0,750	1,153	0,350
II	4	10	m	47,4	89.250	0,618	1,304	0,717
	5	15	m	48,5	595.450	0,631	1,346	0,588
	6	17	w	45,1	115.850	0,658	1,316	0,574
	7	19	w	39,6	42.050	0,557	1,299	0,659
III	8	23	m	45,5	51.750	0,634	1,492	0,733
	9	24	m	42,2	19.450	0,565	1,520	0,836
	10	26	w	37,7	88.800	0,453	1,348	0,765
	11	28	m	34,1	97.500	0,492	1,433	0,685
IV	12	35	m	35,5	18.300	0,522	1,572	0,765
	13	36	m	43,0	70.050	0,528	1,432	0,791
	14	37	w	20,0	28.050	0,450	1,260	0,717
	15	39	w	33,4	32.850	0,470	1,269	0,762
V	16	44	m	49,0	61.250	0,468	1,244	0,796
	17	45	m	31,7	81.050	0,454	1,367	0,817
	18	49	m	45,3	71.100	0,506	1,361	0,854
	19	51	m	49,9	66.400	0,462	1,224	0,804
	20	56	m	16,5	14.050	0,224	0,848	0,530
	21	62	m	48,6	137.450	0,390	1,298	0,867
	22	63	w	18,0	106.050	0,531	1,072	0,661
VI	23	71	m	26,4	52.550	0,396	1,353	0,820
	24	76	m	32,4	30.700	0,585	1,482	0,781
	25	78	w	24,9	28.200	0,423	1,378	0,733
	26	81	w	48,1	16.450	0,591	1,445	0,659



Abb. 9

Aminosucker- (■), Galactose- (○) und Uronsäuregehalt (●) der durch Extraktion in 4 M Guanidiniumchlorid aus *Processus xiphoideus* gewonnenen Rohproteoglykane in Abhängigkeit vom Lebensalter.

ist jedoch zu beachten, daß die Höhe des Sulfateinbaus - und damit die spezifische Radioaktivität der extrahierten Proteoglykane - in der vorliegenden Versuchsanordnung nicht ausschließlich durch das Lebensalter bestimmt wird, sondern in besonders starkem Maße von dem Zeitraum zwischen Exitus und Beginn des Inkubationsversuches abhängt (s. Diskussion).

Die altersabhängigen Veränderungen des Einbaus von Radio-sulfat in die Proteoglykane des Knorpelgewebes und die Syntheserate der Proteoglykane werden deutlicher, wenn die Einzelproben in Altersklassen zusammengefaßt und für die Analysenergebnisse entsprechende Durchschnittswerte ermittelt werden.

Die Wahl der Altersklassen wurde nach Gelfiltration der Einzelproben auf Sepharose 4B CL (analytisch) unter Berücksichtigung der erhaltenen Einzelprofile vorgenommen. Demnach ließen sich die Proben von 0 - 1 Jahr (I), von 10 - 20 J. (II), von 21 - 30 J. (III), von 31 - 40 J. (IV), von 41 - 65 J. (V) und von 70 - 81 J. (VI) zusammenfassen.

Aus Tabelle 2 und den Abbildungen 10 - 12, in denen eine entsprechende Aufschlüsselung vorgenommen wurde, ist ersichtlich, daß spezifische Radioaktivität und Syntheserate der Proteoglykane ein klares Maximum zwischen dem 10. und 20. Lebensjahr aufweisen und daß auch die Gewebskonzentration in diesem Lebensabschnitt am höchsten ist.

Insgesamt läßt sich aus der analytischen Charakterisierung der Proteoglykane und ihrer spezifischen Radioaktivität ableiten, daß die Syntheserate altersabhängigen Veränderungen unterworfen ist und auch das Verteilungsmuster der Hauptglykosaminoglykane des Knorpelgewebes - Chondroitinsulfat und Keratansulfat - Änderungen erfährt.

Diese Fragen werden in den folgenden Abschnitten untersucht.

Tab.2
Gewebskonzentration, spezifische Radioaktivität und Gesamtradioaktivität der aus Pro-
cessus xiphoideus extrahierten Proteoglykane in 6 verschiedenen Altersklassen.

Altersklasse	I	II	III	IV	V	VI
mg/g FG x 10 ⁻³	42,4	45,2	39,9	33,0	37,0	32,9
cpm/ μ Mol HexN	78,3	160,0	44,5	27,0	63,8	22,6
cpm x 10 ⁻³ /g FG	3,38	9,52	2,57	1,23	2,84	1,05

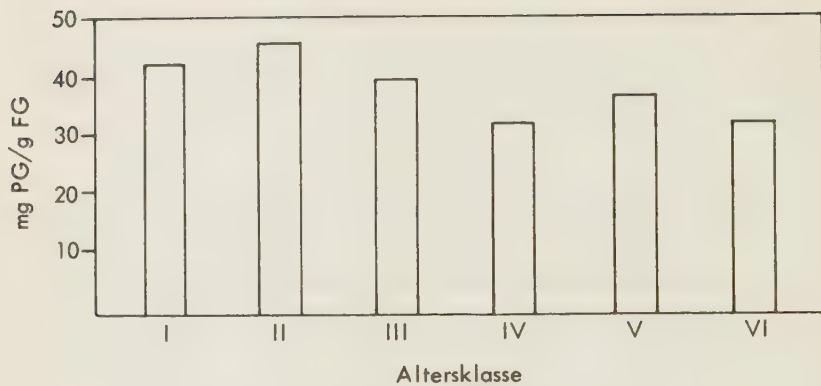


Abb.10

Gewebskonzentration der Proteoglykane des Processus xiphoideus in 6 verschiedenen Altersklassen. Angabe in mg/g Frischgewicht.

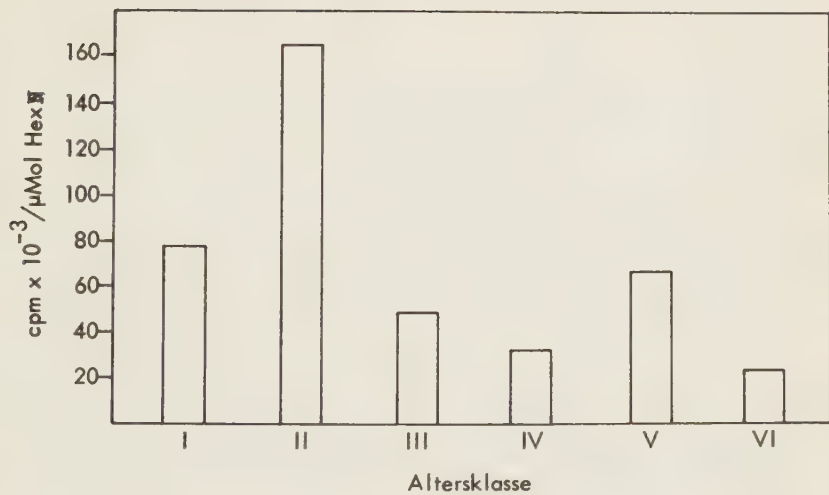


Abb.11

Spezifische ^{35}S -Radioaktivität der aus Processus xiphoideus extrahierten Proteoglykane in 6 verschiedenen Altersklassen. Angabe in $\text{cpm}/\mu\text{Mol Hexosamin}$.



Abb.12

³⁵S-Gesamtradioaktivität der Proteoglykane des Processus xiphoideus in 6 verschiedenen Altersklassen. Angabe in cpm/g Frischgewicht des Gewebes.

4.2 Fraktionierung der Proteoglykane des Processus xiphoideus durch gelchromatographische Trennung unter dissoziativen Bedingungen

Die Gesamtproteoglykane des Knorpelgewebes des Processus xiphoideus bestehen aus zahlreichen Molekülpopulationen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, die sich durch Gelchromatographie an Sepharose 4B CL trennen lassen.

Um Aggregationseffekte der Proteoglykane untereinander bzw. mit Hyaluronat und Protein Link (s. Einleitung) zu vermeiden, wurde die Trennung in Gegenwart von 4 M Guanidiniumchlorid und unter Verwendung guanidiniumchloridresistenter vernetzter Sepharose vorgenommen.

Die nach Trennung erhaltenen Einzelfraktionen wurden auf ihren Gehalt an Hexosamine, Glucuronsäure und Galactose getestet. Außerdem wurde die Radioaktivität durch Szintillationsmessung ermittelt.

Die bei der Trennung der Proteoglykane der Altersklassen I - VI erhaltenen Elutionsprofile sind in der Abbildung 13a und b wiedergegeben. Das Ergebnis weist auf eindeutige altersabhängige Veränderungen in der Molekulargewichtsverteilung der Rohproteoglykane hin.

Mit Ausnahme der Altersklasse I lassen sich im ganzen 3 Hauptfraktionen erkennen, die Proteoglykanen bzw. Hexosamin- und Galactose-haltigen polymeren Molekülpopulationen entsprechen, die sich um jeweils 1 Elutionsmaximum gruppieren und die K_{av} -Werte von a) 0,1 - 0,2, b) 0,2 - 0,5 und c) 0,5 - 0,8 aufweisen.

Die Fraktionen a, b und c entsprechen Molekulargewichtsbereichen von a = größer als 4×10^6 , b = $4 \times 10^6 - 5 \times 10^5$, c = kleiner als 5×10^5 .

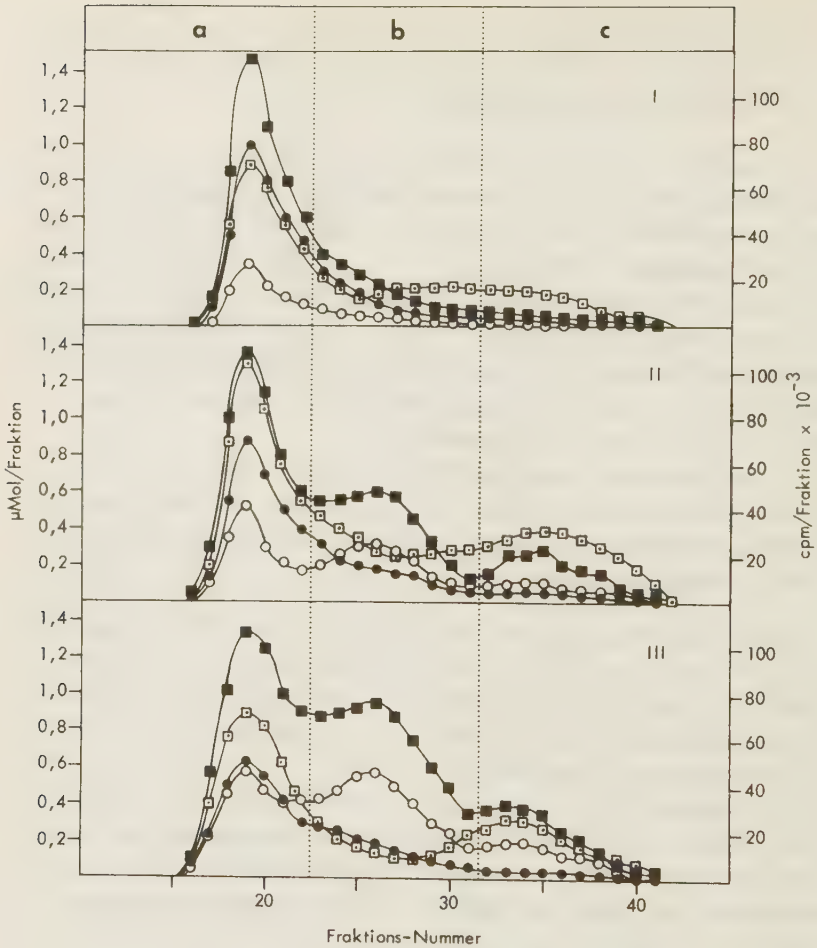


Abb.13a

Gelchromatographische Trennung der aus *Processus xiphoideus* extrahierten Proteoglykane in analytischem Maßstab unter dissoziativen Bedingungen an Sepharose 4B CL. Elutionsprofile für Uronsäure (●), Galactose (○), Hexosamin (■) und ³⁵S-Radioaktivität (□). Darstellung der an Altersklassen I - III gewonnenen Ergebnisse. Entsprechend dem Hexosamin-elutionsprofil wurde durch präparative Trennung eine Unterteilung in die Fraktionen a, b und c vorgenommen (s. Tab.3).

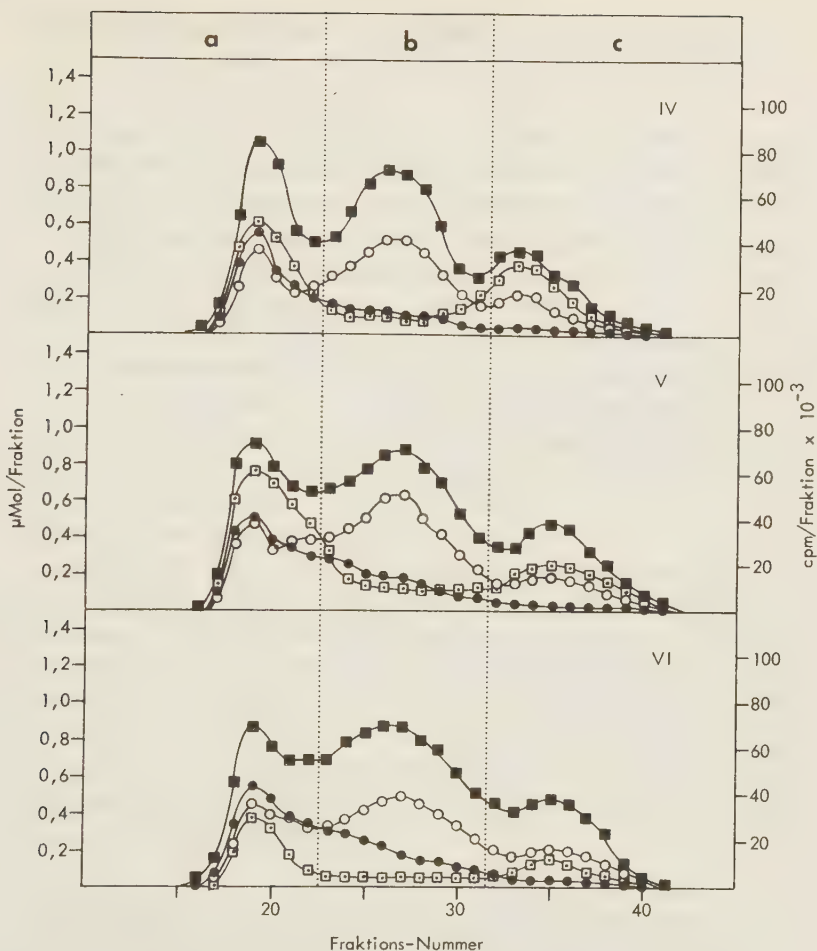


Abb. 13b

Gelchromatographische Trennung der aus Processus xiphoideus extrahierten Proteoglykane in analytischem Maßstab unter dissoziativen Bedingungen an Sepharose 4B CL. Elutionsprofile für Uronsäure (●), Galactose (○), Hexosamin (■) und ^{35}S -Radioaktivität (◻). Darstellung der an Altersklassen IV - VI gewonnenen Ergebnisse. Entsprechend dem Hexosamin-elutionsprofil wurde durch präparative Trennung eine Unterteilung in die Fraktionen a, b und c vorgenommen (s. Tab.3).

4.3 Altersabhängige Veränderungen der Molekulargewichtsverteilung der Proteoglykane

Während in der Altersklasse I (0 - 1 Jahr) ein einziger symmetrischer, der höchsten Molekulargewichtsklasse entsprechender, Elutionsgipfel nachweisbar ist, in dem Radioaktivität und analytischer Parameter den gleichen Verlauf aufweisen, zeigt sich mit zunehmendem Lebensalter eine kontinuierliche Reduktion des Elutionsgipfels a unter gleichzeitiger Zunahme der Elutionsgipfel b und c sowie eine Verschiebung des Hexosamin-Glucuronsäure-Quotienten bzw. des Galactose-Glucuronsäure-Quotienten. Bemerkenswert ist weiterhin, daß ^{35}S -Sulfataktivität vorzugsweise in den Elutionsgipfeln a und c nachweisbar ist.

Die Ergebnisse der Proteoglykanfraktionierung an Sepharose 4B bestätigen die von Husmann (49) gewonnenen Ergebnisse, nach denen mit zunehmendem Alter eine zunehmende Polydispersität der Proteoglykane beobachtet wird, die auf eine vermehrte Bildung niedermolekularer Chondroitinsulfat/Keratansulfat-Hybride mit höherem Keratansulfatanteil zurückgeführt wird.

Auf das Phänomen der unerwartet geringen Radioaktivität der Proteoglykanfraktion b wird in der Diskussion näher eingegangen.

4.4 Altersabhängige Veränderungen der spezifischen Radioaktivität und chemischen Zusammensetzung der durch Gelchromatographie getrennten Proteoglykanfraktionen

Für die weitere chemische Charakterisierung der im Abschnitt 4.2 nachgewiesenen Proteoglykanfraktionen wurde eine Trennung der Rohproteoglykane durch Gelchromatographie an Sepharose 4B im präparativen Maßstab durchgeführt (s. Methodik).

Das methodische Vorgehen entsprach den für die analytische Trennung der Proteoglykane angewandten Verfahren mit der Aus-

nahme, daß jeweils 150 mg Gesamtproteoglykane für die Trennung eingesetzt und die den Elutionsgipfeln entsprechenden Einzelfractionen der Fractionen a - c jeweils vereinigt und durch Äthanol-fällung erhalten wurden. Die Werte der Tabelle 3 beweisen, daß die aus den analytischen Daten bereits gewonnenen Resultate über das Proteoglykanverteilungsmuster durch die präparative Trennung bestätigt und durch die Gewinnung der Substanzmengen weiter quantifiziert wurde.

Die im Ausschlußvolumen eluierte Proteoglykanfraction, die in der Altersgruppe I noch mehr als 80% des gesamten fällbaren Materials ausmacht, geht mit zunehmendem Alter kontinuierlich auf einen Wert von etwa 39% zurück unter gleichzeitiger Zunahme der Fractionen b und c in den Altersklassen II - VI.

Um zu prüfen, wie hoch der Proteinanteil der präparativ gewonnenen Proteoglykanfractionen a - c in den verschiedenen Altersklassen war, wurde ein proteolytischer Abbau mit Hilfe von Papain durchgeführt und die nach Proteolyse verbleibenden durch das Papain nicht angreifbaren Polysaccharidketten (Chondroitinsulfat und Keratansulfat) als Glykosaminoglykane isoliert. Tabelle 4 ergibt die bei diesem Experiment erhaltenen Ergebnisse wieder.

Die Analysen lassen keine Aussage darüber zu, ob es sich bei den in Tabelle 4 angegebenen Werten für den Proteinanteil der Proteoglykanfractionen a - c ausschließlich um die Proteinkomponente (Proteincore der Proteoglykanmoleküle) oder aber um Fremdproteine handelt, die nicht Bestandteil der Proteoglykane, sondern lediglich Gewebsproteine mit gleichem Molekulargewicht sind. Für die Proteoglykanunterfraction a ist diese Annahme jedoch wegen des Molekulargewichtes von größer als 1×10^6 wenig wahrscheinlich.

Unter dieser Voraussetzung ist aus den Werten der Tabelle 4 abzuleiten, daß der Proteingehalt für das hochmolekulare

Tab.3

Proteoglykan-Mengenrelation der aus Processus xiphoideus erhaltenen Proteoglykanunterfraktionen a, b und c. Ergebnisse für 6 verschiedene Altersklassen.

Alters- klasse	g PG/100 g Gesamt-PG Fraktion		
	a	b	c
I	81,1	18,9	
II	58,0	27,5	14,5
III	55,6	29,6	14,8
IV	49,4	31,9	18,7
V	46,1	37,0	16,9
VI	38,9	41,3	19,8

Tab.4

Proteingehalt der aus Processus xiphoideus erhaltenen Proteoglykanunterfraktionen a, b und c. Ergebnisse für 6 verschiedene Altersklassen.

Alters- klasse	mg Protein/100 mg PG		
	a	b	c
I	35,2		
II	30,8	19,2	23,2
III	28,6	21,0	20,2
IV	27,2	25,4	27,4
V	21,0	24,2	24,2
VI	19,2	25,2	26,6

native Proteoglykan (PGS) mit zunehmendem Alter abnimmt. In der Proteoglykanfraktion b ist jedoch ein umgekehrter, allerdings weniger ausgeprägter Trend erkennbar. Der Proteingehalt nimmt im Laufe des Lebens von 19,2% auf 25,2% zu. Da die Proteoglykanfraktion c Molekulargewichtsbereichen entspricht, die auch in der Größenordnung zahlreicher Gewebsproteine liegen, kommt den Proteinanalysen dieser Fraktion geringere Aussagekraft zu.

Die Protein- und Aminosuckerprofile, die nach Fraktionierung der Proteoglykane an Sepharose erhalten wurden, sind für die Altersklassen I, III und VI in Abb.14 dargestellt.

Für die Charakterisierung der Proteoglykane sind nicht nur Molekulargewicht und Proteinanteil, sondern auch die chemische Zusammensetzung der Glykosaminoglykanseitenkette und für die Analyse der Alternsveränderungen auch die spezifische Radioaktivität der Glykosaminoglykane von Interesse.

In Tab.5 sind die Werte der Kohlenhydratanalyse der durch präparative Gelchromatographie erhaltenen Proteoglykanfraktionen a - c dargestellt. Bei einer Zusammensetzung der Glykosaminoglykanseitenketten aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat gibt der Glucuronsäuregehalt in erster Näherung den Chondroitinsulfatanteil, der Galactosegehalt dagegen den Keratansulfatanteil wieder, sofern die molare Konzentration an Hexosamin etwa der Summe der molaren Glucuronsäure- und Galactosekonzentration entspricht.

Danach ergibt sich für die Fraktion a mit zunehmendem Alter eine klare Verschiebung des Chondroitinsulfat/Keratansulfatverhältnisses unter relativer Zunahme des Keratansulfatanteiles, wie aus dem alternsabhängigen Anstieg des Galactosegehaltes und dem Abfall der Glucuronsäurekonzentration erkennbar ist. Im Laufe des Lebens nimmt der Chondroitinsulfat/Keratansulfat-Quotient von 3 (Altersgruppe I) bis auf 1 (Altersgruppe VI) ab.

In der Proteoglykanfraktion b sind diese Veränderungen weniger deutlich, doch läßt sich bei konstanten Galactose-

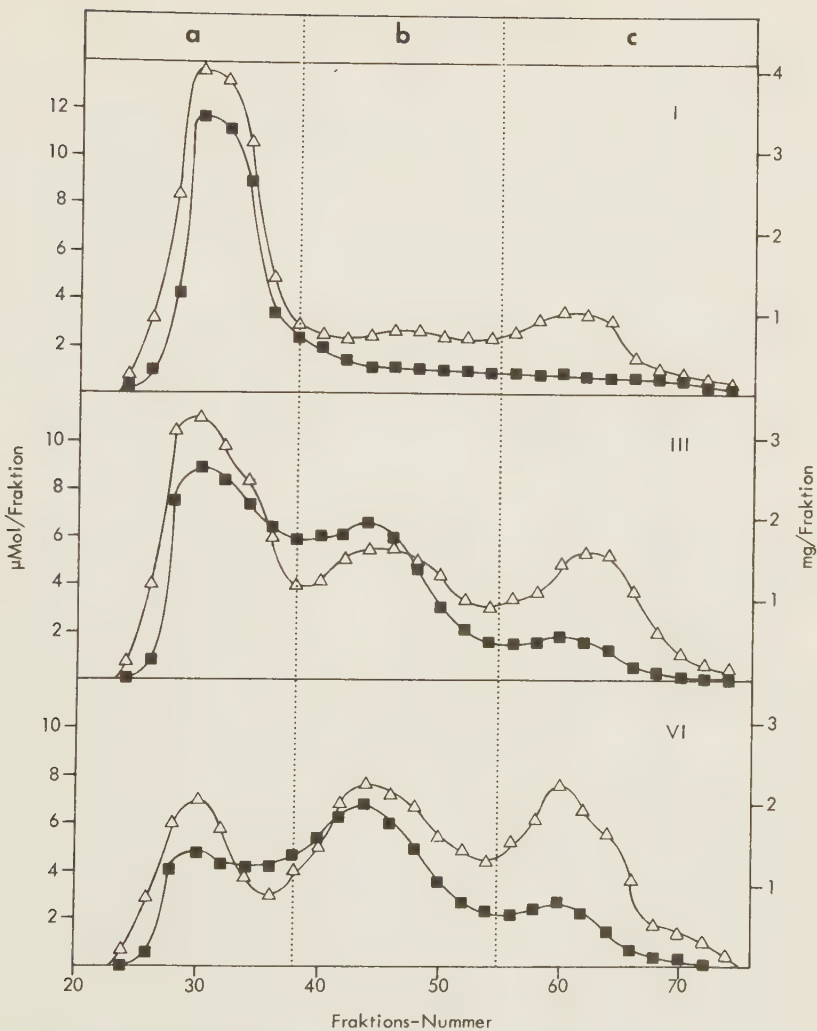


Abb. 14

Vergleichende Analyse des Protein- und Aminosuckergehaltes nach gelchromatographischer Trennung der Proteoglykane der Altersklassen I, III und VI. Angabe von Protein (Δ) in mg/Fraktion, Angabe von Hexosamin ($\blacksquare$) in $\mu\text{Mol}/\text{Fraktion}$.

Tab.5

Uronsäure-, Galactose- und Hexosaminanalysen der nach präparativer Gelfiltration gewonnenen Proteoglykanfraktionen a - c. Angabe für 6 verschiedene Altersklassen.

Alters- klasse	Proteoglykanfraktion								
	a			b			c		
	GlcUA	Gal	HexN $\mu\text{Mol/mg}$	GlcUA	Gal	HexN $\mu\text{Mol/mg}$	GlcUA	Gal	HexN $\mu\text{Mol/mg}$
I	1,20	0,43	1,59	0,57		0,33		0,67	
II	1,09	0,68	1,75	0,61	1,67	1,97	0,22	1,04	0,81
III	0,91	0,96	1,72	0,40	1,81	2,08	0,10	0,93	0,68
IV	0,87	0,91	1,71	0,34	1,88	2,12	0,13	1,27	0,88
V	0,80	1,08	1,69	0,28	1,83	1,99	0,12	1,35	0,89
VI	0,84	0,96	1,71	0,33	1,86	1,88	0,13	1,01	0,86

werten die Abnahme des Glucuronsäuregehaltes auch für diese Fraktion nachweisen. Im Gegensatz zur Proteoglykanfraktion a ist Keratansulfat in allen Altersklassen der vorherrschende Glykosaminoglykanbestandteil, der in der Altersgruppe II ca. 75% und in Altersgruppe VI nahezu 90% der Gesamtglykosaminoglykane ausmacht. Genaue Analysen werden durch Trennung bzw. Fraktionierung von Chondroitinsulfat und Keratansulfat erhalten (s.Abschnitt 4.5).

Nach den Ergebnissen der Analysen scheint die Proteoglykanfraktion c neben Glykosaminoglykanen noch weitere galactosehaltige Verbindungen - vermutlich Glykoproteine - zu enthalten. Dies muß aus dem Befund geschlossen werden, daß in allen Altersklassen der Galactosegehalt höher ist als der Hexosamingehalt.

Tab.6 zeigt die spezifische Radioaktivität der Proteoglykanfraktionen a - c in Abhängigkeit vom Lebensalter. Um auszuschließen, daß ^{35}S -Sulfat unspezifisch an Proteoglykanfraktionen assoziiert war, wurden alle Fraktionen einem proteolytischen Abbau durch Papain mit anschließender Dialyse unterworfen. Diese Maßnahme war ohnehin für eine Trennung von Chondroitinsulfat und Keratansulfat erforderlich. Die Werte der Tab.6 geben jeweils die Durchschnittswerte der spezifischen Radioaktivität der Summe von Chondroitinsulfat und Keratansulfat an, so daß Schlußfolgerungen bezüglich des Verhaltens von Chondroitinsulfat oder Keratansulfat im einzelnen nicht möglich sind.

Tab.6

Spezifische Radioaktivität der aus den Proteoglykanfraktionen a - c erhaltenen Glykosaminoglykane in 6 verschiedenen Altersklassen. Angabe in $\text{cpm} \times 10^{-3} / \mu\text{Mol HexN}$.

Alters- klasse	Spezifische Radioaktivität ($\text{cpm} \times 10^{-3} / \mu\text{Mol HexN}$) der GAG aus Fraktion		
	a	b	c
I	13,0		
II	67,0	29,5	16,5
III	20,0	6,0	4,5
IV	12,0	3,0	3,5
V	27,5	5,5	7,5
VI	17,5	4,0	4,0

4.5 Verteilungsmuster und Radioaktivität von Chondroitinsulfat und Keratansulfat in den Proteoglykanfraktionen a - c

Nach erschöpfender Proteolyse und Dialyse enthalten die Proteoglykanfraktionen a - c ausschließlich Glykosaminoglykane des Processus xiphoideus, als deren Hauptkomponenten Chondroitinsulfat und Keratansulfat identifiziert wurden. Diese beiden Glykosaminoglykane waren bezüglich ihrer Mengenkorrelation und ihrer spezifischen Radioaktivität zu charakterisieren.

Für die Bestimmung des prozentualen Anteils von Chondroitinsulfat und Keratansulfat in den Proteoglykanfraktionen a - c wurden 3 verschiedene Methoden herangezogen:

1. Die Bestimmung des Glucuronsäure- und Galactosegehaltes gibt bei bekannter Zusammensetzung des Chondroitinsulfats bzw. Keratansulfats aus den Disaccharideinheiten GlcUA-GalNAc-Sulfat bzw. Gal-GlcNAc-Sulfat den Chondroitinsulfat- bzw. Keratansulfatgehalt der Analysenprobe wieder. Das Ergebnis hängt von der Qualität und Genauigkeit der Analysenmethoden (s. Abschnitt 3.0) ab.
2. Die dünnschichtchromatographische Trennung von Chondroitinsulfat und Keratansulfat ermöglicht über eine photographische Dokumentation der durch spezifische Anfärbung dargestellten Einzelkomponenten eine Quantifizierung durch densitometrische Auswertung.
3. Nach spezifischem Abbau eines Chondroitinsulfat-Keratansulfat-Gemisches mit Chondroitinase AC bzw. ABC erhält man nach anschließender Trennung durch Gelfiltration neben dem nicht abgebauten Keratansulfat Chondroitinsulfatabbauprodukte mit der Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung des Hexosaminanteiles von der Keratansulfatkomponente.

Die mit den drei genannten Methoden gewonnenen Ergebnisse sind als Zahlenwerte in Tabelle 7 zusammengestellt.

Eine photographische Wiedergabe der nach dünnschichtchromatographischer Trennung durch Färbung sichtbar gemachten Glykosaminoglykane enthält die Abbildung 15.

Ein Beispiel für die gelchromatographische Trennung der Glykosaminoglykane nach enzymatischem Abbau mit Chondroitinase AC gibt Abb.16. Die mit dem Ausschlußvolumen eluierte Aktivität entspricht dem enzymatisch nicht angegriffenen ^{35}S -markierten Keratansulfat, während die retardierte Radioaktivität, die in 2 Elutionsgipfeln (Fraktion 40 bzw. Fraktion 50) erscheint, als Tetrasaccharid bzw. Disaccharid ($\Delta^5\text{-GlcUA-GalNAc-Sulfat}$) des Chondroitinsulfats identifiziert wurde.

Dafür sprechen auch Untersuchungen von Hiyama und Okada über Abbaueigenschaften des aus *Arthrobacter aureus* isolierten Enzyms (63,64). Dies wird auch durch weitere experimentelle Untersuchungen über den Abbau von Glykosaminoglykanen durch Chondroitinsulfatlyasen belegt (65,66).

Die Identität des im Ausschlußvolumen eluierten Keratansulfat wurde durch Dünnschichtchromatographie und Vergleich mit authentischem Keratansulfat gesichert (Abb.17).

Die Frage, ob der im Ausschlußvolumen eluierte Radioaktivitätsgipfel neben dem ^{35}S -Keratansulfat noch weiter nicht durch Chondroitinase AC angreifbare Glykosaminoglykane enthält, wurde durch zusätzliche Abbauprobungen mit Chondroitinase ABC nachgegangen. Bei einem vergleichenden Abbau der Proteoglykanfraktion a der Altersgruppen IV und V mit Chondroitinase AC und Chondroitinase ABC ergab sich, daß der Chondroitinase ABC-Abbau zu einer Reduktion der im Ausschlußvolumen eluierten Radioaktivität um 3,2% (Altersgruppe IV) bzw. 2,4% (Altersgruppe V) führt. Dieser zusätzliche Abbau deutet auf eine Kontamination des Keratansulfats mit Dermatansulfat hin. Unter der Voraussetzung, daß Dermatansulfat eine zweimal höhere spezifische Radioaktivität als Chondroitinsulfat aufweist (67), läßt sich ein Dermatansulfatgehalt der Proteoglykanfraktion a von etwa 1% berechnen.

Tab. 7

Vergleichende Darstellung der mit drei verschiedenen Analysemethoden erhaltenen Ergebnisse einer quantitativen Bestimmung von Chondroitinsulfat und Keratansulfat in den Fraktionen a - c. A = Ermittlung des Chondroitinsulfat/Keratansulfatverhältnisses aus der Ursubstanz- und Galactoseanalyse, B = Densitometrische Bestimmung des Chondroitinsulfat- und Keratansulfatgehaltes nach dünnschichtchromatographischer Trennung der Glykosaminoglykane, C = Chondroitinsulfat/Keratansulfatverhältnis nach Abbau der Glykosaminoglykane mit Chondroitinase AC und Berechnung des Keratansulfatgehaltes aus der Aminosugaranalyse nach gelchromatographischer Trennung.

	A			B			C			Mittelwert A - C		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
	CS	KS	CS	KS	CS	KS	CS	KS	CS	KS	CS	KS
I	73	27		86	14		80	20		80	20	
II	60	40	27	73	17	83	69	31	20	80	17	73
III	49	51	18	82	10	90	43	57	11	89	18	82
IV	49	51	15	85	9	91	55	45	10	90	14	86
V	42	58	13	87	8	92	42	58	12	88	14	86
VI	47	53	15	85	11	89	60	41	14	86	13	87

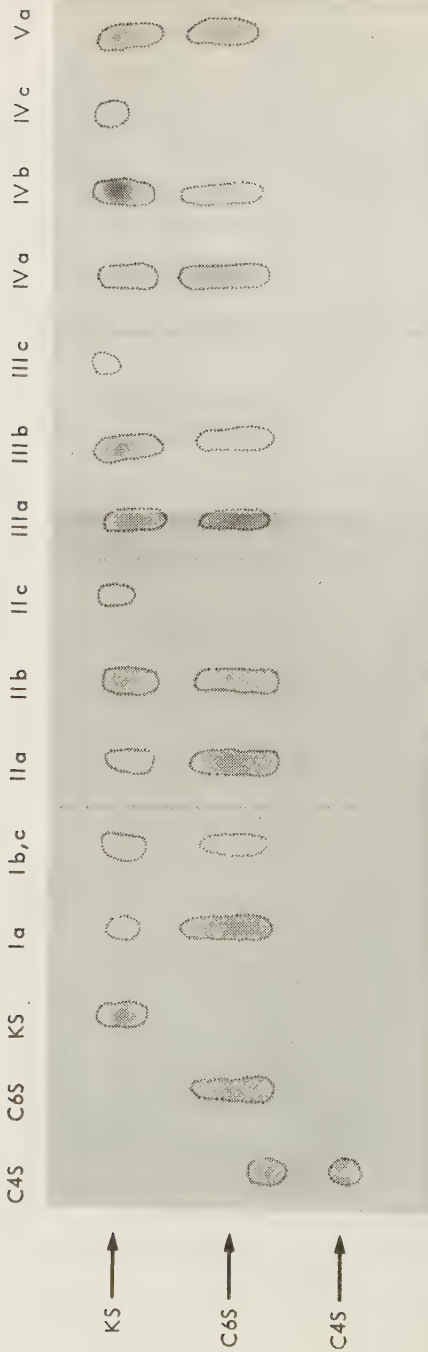


Abb. 15

Dünnschichtchromatographische Trennung der aus den Proteoglykanfraktionen a - c durch proteolytischen Abbau erhaltenen Glykosaminoglykane. Trennung von Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat. Angaben für die Altersklassen I - IV.

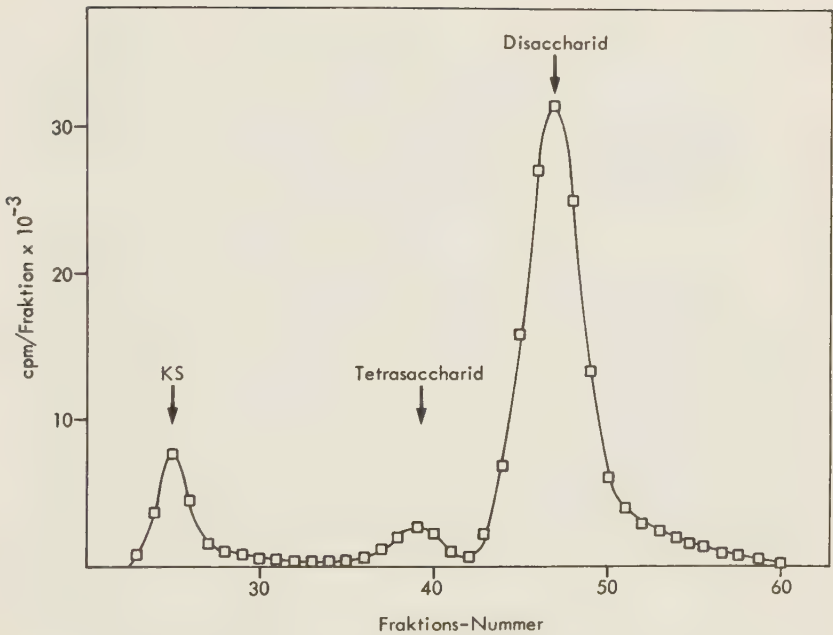


Abb.16

Beispiel für die gelchromatographische Trennung der Glykosaminoglykane aus *Processus xiphoideus* (gewonnen durch proteolytischen Abbau der Proteoglykane der Proteoglykanfraktionen) nach Abbau mit Chondroitinase AC. Keratansulfat wird im Ausschlußvolumen eluiert, die durch die Chondroitinase erhaltenen Disaccharide (bzw. Tetrasaccharide) des Chondroitinsulfats werden durch das Gel zurückgehalten.

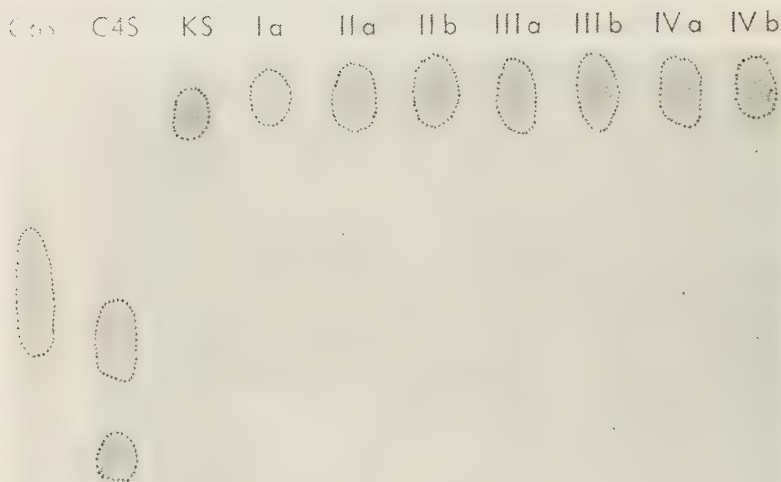


Abb.17

Identifizierung der nach Abbau von Glykosaminoglykanen mit Chondroitinase AC im Ausschlußvolumen (s. Abb.16) erhaltenen Radioaktivität als Keratansulfat. Dünnschichtchromatographischer Vergleich von authentischem Keratansulfat mit den aus den angegebenen Altersklassen erhaltenen Keratansulfatfraktionen.

4.6 Spezifische Radioaktivität und Syntheseraten von Chondroitinsulfat und Keratansulfat

Bei Bezug der für Chondroitinsulfat und Keratansulfat ermittelten Radioaktivität auf ihren Hexosamingehalt errechnet sich die spezifische Radioaktivität für Chondroitinsulfat und Keratansulfat in den Proteoglykanfraktionen a und b. Die dabei erhaltenen Werte, die in Tab.8 zusammengestellt sind, erlauben folgende Feststellungen:

1. Unabhängig vom Alter ist die spezifische Radioaktivität des Chondroitinsulfats in der Proteoglykanfraktion a etwa 6-fach höher als diejenige des Keratansulfats. In der Fraktion b sind diese Unterschiede in einem 20-mal höheren Wert für Chondroitinsulfat noch größer.

Die spezifische Radioaktivität des Chondroitinsulfats ist jedoch in den Proteoglykanfraktionen a und b etwa gleich, während die spezifische Radioaktivität des Keratansulfats in der Fraktion a etwa dreimal höher ist als in der Fraktion b.

2. Bezüglich der altersabhängigen Veränderungen ist der für die Gesamtproteoglykane bereits ermittelte Abfall der spezifischen Radioaktivität in Abhängigkeit vom Lebensalter deutlich erkennbar. Er gilt sowohl für das Chondroitinsulfat als auch für das Keratansulfat und auch für die Fraktionen a und b, wobei jedoch die großen individuellen zum Teil durch Vorbehandlung mit ionisierenden Strahlen, Medikamenten, aber auch durch den unterschiedlichen Zeitraum zwischen Eintritt des Todes und Beginn des Versuches bedingten Schwankungen zu berücksichtigen sind. Dies erklärt, warum z.B. die Durchschnittswerte der Radioaktivität in der Alternsklasse V höher liegen als in der Alternsklasse IV.

Tab.8

Spezifische Radioaktivität des aus den Proteoglykanfraktionen a und b erhaltenen Chondroitinsulfat und Keratansulfat.

	Spezifische Radioaktivität (cpm x 10 ⁻³ /μMol HexN)			
	PG-Fraktion a		PG-Fraktion b	
	CS	KS	CS	KS
I	15,25	2,60		
II	78,35	24,45	73,10	3,65
III	37,40	5,65	35,05	2,15
IV	17,80	2,70	23,65	0,70
V	52,60	5,20	35,30	1,45
VI	25,55	3,50	21,80	1,10

Die innerhalb des Inkubationszeitraumes inkorporierte Gesamtradioaktivität ist ein Maß für die Syntheserate des Gewebes.

Obgleich Aussagen über altersabhängige Veränderungen der Syntheseraten im Hinblick auf die genannten individuellen Schwankungen problematisch bleiben, lassen sich jedoch innerhalb einer Altersgruppe bzw. einer Einzelprobe Aussagen über die biogenetische Beziehung zwischen der Proteoglykanfraktion a und b durch Auswertung der Syntheseraten gewinnen.

In Tab.9 sind die Werte für die in Chondroitinsulfat bzw. Keratansulfat inkorporierte Gesamtradioaktivität der Fraktionen a und b bezogen auf das Frischgewicht dargestellt.

Hierbei ergibt sich - unter Vernachlässigung einer Analyse altersabhängiger Veränderungen - , daß die Gesamtradioaktivität des Chondroitinsulfats der Fraktion a durchweg höher liegt als diejenige der Fraktion b, daß jedoch die in das Keratansulfat inkorporierte Gesamtradioaktivität der Proteoglykanfraktion a und b in allen Altersklassen in der gleichen Größenordnung liegen. Die aus diesen Befunden abzuleitenden Schlußfolgerungen sind im Abschnitt "Diskussion" dargestellt.

Tab.9

³⁵S-Gesamtradioaktivität, die in das in 1g Knorpelgewebe enthaltene Chondroitinsulfat bzw. Keratansulfat inkorporiert wurde. Vergleich der Fraktionen a und b. Angaben für 6 verschiedene Altersklassen.

	Gesamt-Radioaktivität (cpm x 10 ⁻³ /g FG)			
	Fraktion a		Fraktion b	
	CS	KS	CS	KS
I	681,10	29,10		
II	3503,45	506,30	2170,50	422,70
III	1058,15	209,10	418,05	204,05
IV	567,50	70,15	301,45	81,10
V	1461,45	197,40	496,55	151,70
VI	652,45	60,60	227,30	72,20

5.0 Diskussion

5.1 Untersuchungsgut und methodische Voraussetzungen

Eine Untersuchung der chemischen und makromolekularen Eigenschaften und der Stoffwechseldynamik der Proteoglykane des Knorpelgewebes sowie die altersabhängigen Veränderungen dieser Parameter ist an bestimmte Voraussetzungen gebunden. Sie betreffen die Wahl und die Eigenschaften des Untersuchungsgutes und das Spektrum der zur Verfügung stehenden analytischen und präparativen Methoden.

Die Tatsache, daß die Entnahme des Untersuchungsgutes bei der Obduktion erst 24 - 48 Stunden post mortem erfolgen konnte, muß als einer der möglichen die Untersuchungsergebnisse beeinflussenden Faktoren angesehen werden. Frühere systematische Versuche am Rindernasenknochen (29) hatten das Ergebnis, daß die Einbauraten von ^{35}S -Sulfat in die Proteoglykane durch postmortale Veränderungen nur geringfügig beeinflusst werden, und innerhalb der ersten 30 Stunden post mortem keine signifikante Abnahme der Einbauraten beobachtet werden konnte, und führen zu der Annahme, daß die möglichen postmortalen Änderungen der Stoffwechselaktivität begrenzt oder doch wenigstens für die untersuchten Einzelproben in vergleichbarer Größenordnung lagen. Die trotzdem beobachteten starken individuellen Unterschiede im Sulfateinbau, die in jedem Alter auftreten und die Beurteilung von Altersveränderungen der Proteoglykanbiosynthese sehr erschweren, deuten darauf hin, daß außer dem Alter im menschlichen Organismus auch andere Einflüsse auf den Stoffwechsel der Proteoglykane des Knorpelgewebes wirksam werden.

Hierfür kommen Erkrankungen, Wirkungen von Medikamenten und Ernährungsverhältnisse in Betracht. In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, daß Glucocorticoide in vivo und in vitro eine inhibierende Wirkung auf den Stoffwechsel

der Proteoglykane ausüben, den ^{35}S -Einbau vermindern und die biologische Halbwertszeit verlängern. Inhibierende Wirkung weisen auch ACTH, Glucagon, Insulinmangel und Hypothyreose auf, während Steigerungen des ^{35}S -Einbaus durch Parathormon, Adrenalin und Insulin, Testosteron und Thyroxin verursacht werden. Zahlreiche Medikamente, u.a. Butazolidin und Derivate, Indometacin und Cytostatika, vermögen dosisabhängig den Knorpelstoffwechsel zu hemmen. Umgekehrt kann auch der Rippenknorpel im Sinne einer unspezifischen universellen Mesenchymreaktion auf toxische und entzündliche oder allergische Reize mit Erhöhung oder Verminderung des ^{35}S -Einbaus antworten.

Die beschriebenen, für die einzelnen Untersuchungsproben nicht bekannten bzw. nicht näher definierten Einflüsse können mit den altersabhängigen Veränderungen im Stoffwechsel der Proteoglykane interferieren. Sie ließen sich jedoch wenigstens zum Teil dadurch ausgleichen oder mildern, daß jeweils mehrere Proben zu einer Altersklasse zusammengefaßt wurden.

Die eingesetzten analytischen bzw. präparativen Verfahren sind zum Teil Standardmethoden. Dies gilt z.B. für die Extraktion und Fraktionierung der Proteoglykanuntereinheiten (PGS) durch Gelfiltration unter dissoziativen Bedingungen, bei denen eine Trennung der PGS nach ihrem hydrodynamischen Volumen bzw. ihrem Molekulargewicht erfolgt. Auch die quantitative Bestimmung von Aminosuckern und Uronsäuren sind übliche und zuverlässige Standardmethoden, dagegen ergeben sich bei der Galactosebestimmung und bei der Ermittlung des Chondroitinsulfat- bzw. Keratansulfatgehaltes der Proteoglykane Probleme.

Die für die quantitative Bestimmung von Galactose in Polysacchariden häufig eingesetzte Anthronmethode ist unspezifisch und liefert insbesondere in Gegenwart eines Überschusses von Uronsäure unzuverlässige Ergebnisse, da in

Gegenwart starker mineralischer Säuren auch Uronsäuren reagieren und das Ergebnis der Anthronreaktion verfälschen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher Versuchsreihen durchgeführt, um die Galactosebestimmung in Proteoglykanen zu optimieren. Ziel der Versuche war eine möglichst verlustfreie Hydrolyse mit Freisetzung der Galactose und ihrer anschließenden enzymatischen Bestimmung im optischen Test mit Hilfe der Galactosedehydrogenase.

Ebenso gibt es für die Bestimmung des Chondroitinsulfat- und Keratansulfatgehaltes in Proteoglykanen keine Methode der Wahl. Die zur Verfügung stehenden Trennungungsverfahren wie unterschiedliche Fällbarkeit durch Cetylpyridiniumchlorid oder Ionenaustauschchromatographie an Dowex 1 x 2 unter Anlegen eines NaCl-Gradienten erwiesen sich als unvollständig und erschienen für vorliegende Fragestellungen ungeeignet. Weitere Verfahren wie Analysen, dünnschichtchromatographische Trennung des CS und KS sowie selektiver Abbau des Chondroitinsulfats durch Chondroitinase AC bieten Vor- und Nachteile, so daß die Entscheidung für eine parallele Durchführung dieser drei Bestimmungsmethoden mit Ermittlung der Durchschnittswerte fiel.

5.2 Chemische und makromolekulare Alternsveränderungen des PGS

Die vorgelegten Ergebnisse liefern einen Beitrag zu den chemischen, makromolekularen und dynamischen Alternsveränderungen der Proteoglykanuntereinheiten (PGS). Obgleich die PGS makromolekulare Bausteine für die Organisation der extrazellulären Matrix darstellen und zusammen mit anderen Molekülen wie z.B. Hyaluronat und Kollagen Aggregate bzw. Strukturen höherer Ordnung bilden, sind die Alternsveränderungen der Proteoglykanuntereinheiten als ein Schlüssels-

prozeß anzusehen, da Veränderungen ihrer chemischen oder makromolekularen Struktur direkte Auswirkungen auf ihre Fähigkeit zur spezifischen Aggregatbildung im Extrazellulärraum erwarten lassen.

Der makromolekularen Struktur der bisher untersuchten Proteoglykane aus verschiedenen hyalinen Knorpelgeweben scheint ein gemeinsames Bauprinzip zugrunde zu liegen, das dadurch charakterisiert ist, daß ein zentrales Protein mit einer variablen Anzahl von Glykosaminoglykanseitenketten kovalent verknüpft ist. Die Glykosaminoglykanseitenketten sind jedoch nicht statistisch angeordnet. Etwa $1/3$ des Proteins bildet eine globuläre Struktur, an der nur wenige oder keine Polysaccharidketten gebunden sind. Diese Region besitzt die spezifische Fähigkeit zur Wechselwirkung mit Hyaluronat und wird als Hyaluronatbindungsregion bezeichnet. Der größte Teil der Keratansulfatseitenketten und einige wenige Chondroitinsulfatseitenketten sind in der "Keratansulfat-reichen Region" des Proteincores lokalisiert. Die restlichen 90% der Chondroitinsulfatketten und einige wenige Keratansulfatketten nehmen das letzte Drittel des Proteincores als "Chondroitinsulfat-reiche Region" ein (s. Abb.2, S.6).

Aus den bisher vorliegenden Literaturangaben sowie den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen lassen sich folgende alternsabhängige Veränderungen in der Struktur der Proteoglykanuntereinheiten ableiten:

1. Das Molekulargewicht des PGS nimmt alternsabhängig ab. Eine solche Abnahme des Molekulargewichts der Proteoglykanuntereinheit läßt sich allerdings durch die Gelchromatographie an Sepharose 4B solange nicht erfassen wie die Molekulargewichtsveränderungen oberhalb des Ausschlußbereichs des Gels liegen.

2. Die durchschnittliche Länge der Chondroitinsulfatseitenketten ist keinen wesentlichen Änderungen unterworfen. Der Chondroitinsulfatgehalt des PGS nimmt jedoch alternsabhängig eindeutig ab.
3. Das Molekulargewicht der Keratansulfatseitenketten und der Absolutgehalt des Keratansulfats im PGS nehmen alternsabhängig zu.
4. Der Quotient Protein/Polysaccharidseitenketten erfährt einen alternsabhängigen Anstieg.
5. Die Fähigkeit des PGS zur Bildung von Aggregaten in Gegenwart von Hyaluronsäure ist unverändert.
6. Mit zunehmendem Alter treten Proteoglykane bzw. Proteoglykanaggregate mit geringerer Dichte bzw. geringerem Molekulargewicht oder hydrodynamischen Volumen auf.

Die alternsabhängigen Veränderungen des PGS lassen sich so deuten, daß es zu einer zunehmenden Verminderung der Chondroitinsulfatketten bzw. der Chondroitinsulfat-reichen Region des Proteincorres kommt, während die Hyaluronatbindungsregion und die Keratansulfatbindungsregion relativ konstant bleiben. Es muß allerdings offenbleiben, ob diese Veränderungen das Ergebnis eines zunehmenden Abbaus der Proteoglykane, die während des Lebens in unveränderter Qualität synthetisiert werden, darstellen oder ob die Biosynthese der Proteoglykane selbst Änderungen unterworfen ist.

Die von Inerot, Heinegard et al. (68) aus Untersuchungen über die Alternsveränderungen tierischen Gelenkknorpels gezogenen Schlußfolgerungen sind in Abbildung 18 dargestellt. Es ist erkennbar, daß in dem für das höhere Lebensalter charakteristischen PGS-Molekül die Abnahme des Molekulargewichts vorwiegend auf Kosten der Chondroitinsulfat-reichen Region geht, so daß Proteingehalt und Keratansulfatgehalt in dem alternsveränderten PGS-Molekül relativ zunehmen. Die Annahme, daß es sich hierbei um das Produkt einer primär veränderten Synthese handelt und nicht um Veränderungen durch

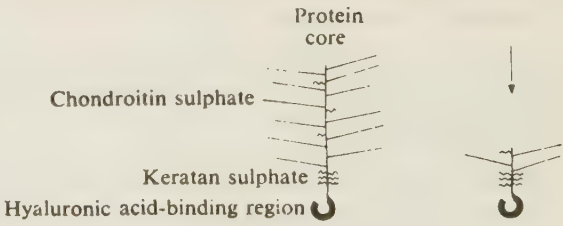
Parameters (relative to the normal proteoglycan)		
Size of proteoglycan monomer	Normal	Small
Size of chondroitin sulphate	Normal	Normal
Chondroitin sulphate content (galactosamine, uronic acid)	Normal	Low
Keratan sulphate content (glucosamine)	Normal	High
Protein content (hyaluronic acid-binding region)	Normal	High
Ability to aggregate	+	+
Buoyant density	Normal	Low

Abb.18

Struktur und Zusammensetzung einer für das frühe Lebensalter typischen Proteoglykanuntereinheit im Vergleich zu einem für das höhere Lebensalter charakteristischen PGS-Molekül (siehe Pfeil) (68).

sekundäre (extrazelluläre) Abbauvorgänge, wird dadurch nahegelegt, daß man im Falle von Abbauprozessen entsprechende Spaltprodukte - z.B. Chondroitinsulfat-reiche Proteinbruchstücke - finden müßte, die aber niemals nachgewiesen wurden. Dieser Annahme ist jedoch entgegenzuhalten, daß solche Fragmente unter Umständen rasch aus dem Gewebe eliminiert oder von den ortsständigen Zellen für einen Endabbau endozytiert worden sind, so daß sie sich einer Nachweisbarkeit entziehen.

Die im Rahmen der experimentellen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse erlauben eine weitergehende Interpretation, da sie durch Einbeziehung von ^{35}S -Inkorporationsstudien auch einen Einblick in die Syntheseprozesse des Knorpelgewebes und ihre Veränderungen im zunehmenden Lebensalter gestatten. Die Ergebnisse von Inerot, Heinegard et al. (68) werden durch die vorliegenden Versuche insofern bestätigt, als nicht nur das PGS-Molekül einer alternsabhängigen chemischen Veränderung (Zunahme des Keratansulfatgehaltes) unterliegt, sondern im Laufe des Lebens auch eine zweite vorwiegend Keratansulfat enthaltende Proteoglykanmolekülpopulation auftritt, die dem von Inerot, Heinegard et al. beschriebenen alternsveränderten Proteoglykanmolekül entspricht.

Bei der Diskussion der Frage, ob die alternsabhängig zunehmende Keratansulfat-reiche Proteoglykanfraktion mit deutlich geringerem Molekulargewicht ein Abbauprodukt der PGS-Fraktion darstellt oder als ein für das Alter charakteristisches Syntheseprodukt der Chondrozyten angesehen werden muß, ist die Tatsache zu berücksichtigen, daß die spezifische Radioaktivität des Chondroitinsulfats der PGS-Fraktion und der Keratansulfat-reichen niedermolekularen Proteoglykanfraktion unbeschadet einer alternsabhängigen Abnahme jeweils gleich sind, während die spezifische Radioaktivität des Keratansulfats in der Keratansulfat-reichen niedermolekularen Proteoglykanfraktion in allen Altersklassen geringer ist als in der PGS-Fraktion. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit der Annahme, daß es sich bei der Keratansulfat-reichen

niedermolekularen Proteoglykanfraktion um ein sekundäres Abbauprodukt des PGS handelt. Unter Berücksichtigung der Erkenntnis, daß Proteoglykane einem extrazellulären Abbau unterliegen können und die entstehenden Spaltprodukte von der Zelle endozytiert und abgebaut werden, ergibt sich aus den Werten für die spezifische und die Gesamtradioaktivität, daß die bei einer extrazellulären proteolytischen Spaltung des PGS entstehenden Chondroitinsulfat-reichen Fragmente offenbar rasch von der Zelle aufgenommen werden, während die schlechter endozytierbaren Keratansulfat-reichen Bruchstücke im Extrazellulärraum akkumulieren (Abb.19).

Auf diese Weise wird verständlich, daß die spezifische Radioaktivität des Chondroitinsulfats in beiden Fraktionen gleich ist, diejenige des Keratansulfats jedoch in der Fraktion b geringer ist, weil hier eine ständige Verdünnung des neu-synthetisierten und sekundär abgebauten Materials mit dem bereits im Extrazellulärraum vorhandenen und sich akkumulierenden Material erfolgt.

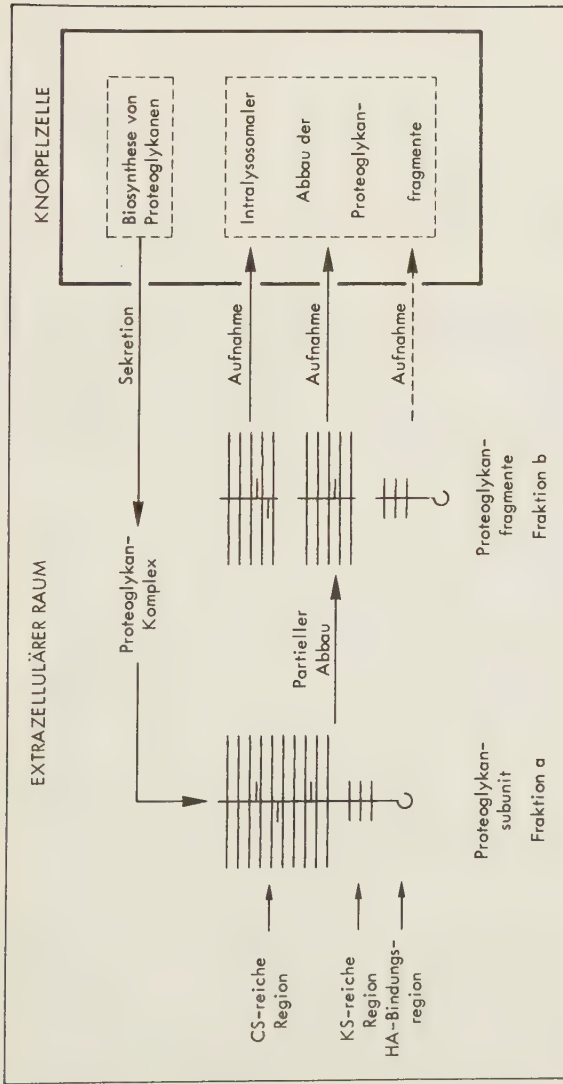


Abb. 19

Schematische Darstellung des extrazellulären, partiellen Proteoglykanabbaus. Die Spaltprodukte von PGS, Chondroitinsulfat-reiche und Keratansulfat-reiche Fragmente (Fraktion b), werden unterschiedlich schnell dem intralysosomalen Abbau in der Knorpelzelle durch Endozytose zugeführt.

6.0 Zusammenfassung

Die Untersuchungen über die altersabhängigen Veränderungen der Proteoglykane des Processus xiphoideus (Schwertfortsatz) des Menschen, der als Obduktionsgut erhalten wurde, umfaßten folgende Parameter:

- a) Chemische Charakterisierung durch quantitative Bestimmung des Hexosamin-, Protein-, Uronsäure- und Galactosegehaltes,
- b) Ermittlung der molekularen Dispersität (Molekulargewichtsverteilung) der Proteoglykane durch Fraktionierung an Sepharose 4B,
- c) Trennung der am Aufbau der Proteoglykane beteiligten Glykosaminoglykane durch Dünnschichtchromatographie mit photographischer Dokumentation und Quantifizierung durch densitometrische Auswertung, durch enzymatischen Abbau von Chondroitinsulfat mit Chondroitinase AC und anschließender Gelfiltration auf Sephadex G 25 und
- d) Bestimmung der spezifischen Radioaktivität der Proteoglykane und der Glykosaminoglykane, Chondroitinsulfat und Keratansulfat, nach in vitro Inkubation des Processus xiphoideus in Gegenwart von ^{35}S -Sulfat sowie die Bestimmung der in der Zeiteinheit in eine definierte Gewichtsmenge Knorpelgewebe inkorporierten Gesamtaktivität.

Die unter a - d genannten Parameter wurden an 26 Gewebeproben bzw. an 6 aus den Gewebeproben gebildeten Altersklassen (I - VI) ermittelt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die Gesamtproteoglykane - charakterisiert als die mit 4 M Guanidiniumchlorid extrahierbaren Anteile der Gewebeproteoglykane - nehmen während der ersten beiden Lebensdezenen zu und im weiteren Verlauf des Lebens ab. Das gleiche Altersprofil zeigen die spezifische Radioaktivität der Proteoglykane und die pro Gramm Knorpelgewebe inkorporierte ^{35}S -Gesamtradioaktivität.
2. Bei Fraktionierung der Proteoglykane an Sepharose 4B unter Bedingungen, bei denen eine Aggregation ausgeschlossen werden kann (dissoziative Bedingungen), stellen

die Proteoglykane der Altersklasse I (Neugeborene bis 1 Jahr) eine einheitliche - vom Gel ausgeschlossene - ^{35}S -markierte Molekülpopulation (a) dar (Molekulargewicht größer als 4×10^6). Mit zunehmendem Alter lassen sich jedoch - entsprechend dem Auftreten weiterer Elutionsmaxima bei Gelfiltration auf Sepharose 4B - zwei weitere ^{35}S -Radioaktivität, Hexosamin und Galactose enthaltene Fraktionen nachweisen, deren Molekulargewicht 5×10^5 bis 4×10^6 (b) und kleiner als 5×10^5 (c) entspricht und deren prozentualer Anteil altersabhängig unter entsprechender Reduktion der Proteoglykanfraktion a zunimmt.

3. Nach proteolytischem Abbau der Proteoglykanfraktion a, b und c wurde das Chondroitinsulfat/Keratansulfatverhältnis und die spezifische ^{35}S -Markierung der Chondroitinsulfat- und Keratansulfatkomponente untersucht. Dabei zeigte sich, daß in der Proteoglykanfraktion der Altersgruppe I Chondroitinsulfat mit 80% den Hauptanteil ausmacht, der sich jedoch altersabhängig reduziert, und daß in der Altersgruppe VI das Chondroitinsulfat/Keratansulfatverhältnis 60 : 40 beträgt. In der Proteoglykanfraktion b ist dagegen Keratansulfat in allen Altersgruppen die Hauptglykosaminoglykankomponente (73% - 87%) bei nur geringen Schwankungen innerhalb der Altersgruppen I - VI.
4. Die spezifische Radioaktivität des Chondroitinsulfats und Keratansulfats nimmt sowohl in den Proteoglykanfraktionen a als auch b altersabhängig ab. Unabhängig von den Altersveränderungen sind in jeder Altersklasse die spezifischen Radioaktivitäten des Chondroitinsulfats der Fraktionen a und b gleich, diejenigen des Keratansulfats in den Proteoglykanfraktionen b jedoch geringer als in der Proteoglykanfraktion a.
5. Die Gesamtradioaktivität, die in das in 1g Gewebe enthaltene Chondroitinsulfat bzw. Keratansulfat inkorporiert wurde und als Maß für die Syntheserate angesehen wird,

zeigt ein für alle Altersklassen charakteristisches Verhalten, und zwar liegt die im Chondroitinsulfat enthaltene Gesamtradioaktivität in der Proteoglykanfraktion a in allen Altersklassen höher als in Fraktion b, während das Keratansulfat der Proteoglykanfraktion a und b in allen Altersklassen die gleiche Gesamtradioaktivität aufweist.

6. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich unter folgenden Annahmen deuten: Die Zellen des Processus xiphoideus synthetisieren zu Beginn des Lebens ein hochmolekulares Proteoglykanmolekül (Proteoglykanfraktion a), das Chondroitinsulfat und Keratansulfat als Polysaccharidkomponenten in einem Verhältnis 80 : 20 enthält. Mit zunehmendem Alter nimmt jedoch nicht nur die Syntheserate dieser Proteoglykanfraktion ab, sondern es treten auch Änderungen in ihrer Zusammensetzung ein, die dadurch charakterisiert sind, daß gleichzeitig der Keratansulfatgehalt des de novo synthetisierten Proteoglykans a zunimmt. Das Proteoglykanmolekül (Fraktion a) wird im Gewebe extrazellulär zu Spaltprodukten mit geringerem Molekulargewicht (Proteoglykanfraktion b) abgebaut. Dieser Prozeß nimmt altersabhängig zu.

7.0 Verzeichnis der Abkürzungen

Å	Angström-Einheit ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Abb.	Abbildung(en)
BSA	bovine serum albumin (kristallisiert)
^{14}C	radioaktives Kohlenstoffisotop mit dem Atomgewicht 14
CaAc	Calciumacetat
CL	cross linked (s.3.4.2)
cpm	Zählimpulse pro Minute (counts per minute)
CS	Chondroitinsulfat
C-4-S	Chondroitin-4-sulfat
C-6-S	Chondroitin-6-sulfat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
ETOH	Äthanol
FG	Frischgewicht
GAG	Glykosaminoglykan(e)
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GlcUA	Glucuronsäure
GuHCl	Guanidiniumchlorid
^3H	Tritium
h	Stunde(n)
Hex N	Hexosamin
KS	Keratansulfat
M	molar (Mol/l)
mM	millimolar (mMol/l)
MG	Molekulargewicht
N ₂	Stickstoffgas
NaAc	Natriumacetat
NAD	NAD ⁺ , Nicotinamidadenindinucleotid
PG	Proteoglykan(e)
PGC	Proteoglykankomplex(e)
PGS	Proteoglykanuntereinheit(en), - subunit(s)

^{35}S	radioaktives Schwefelisotop mit dem Atomgewicht 35
Sephadex G	Dextran mit definierter Porengröße
Sepharose	Agarose mit definierter Porengröße
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit
V_o	Ausschlußvolumen einer Molekularsiebsäule
V_t	Totalvolumen einer Molekularsiebsäule
V_e	Elutionsvolumen einer Molekularsiebsäule

8.0 Literatur

1. Altschuler, C.H. u. D.M. Angevine,
in: Connective Tissue in Health and Disease,
Asboe-Hansen, Kopenhagen, 178, 1954.
2. Bunting, C.H. u. H. Bunting,
Arch. Pathol. 55, 257, (1953).
3. Klemperer, P.,
in: Connective Tissue in Health and Disease,
Asboe-Hansen, Kopenhagen, 251, 1954.
4. Mathews, B.F.,
Brit. Med. J. 1295, (1952).
5. Mathews, M.B.,
Arch. Biochem. Biophysics 43, 181, (1953).
6. Gibian, H.,
Einzeldarst. a. d. Ges.-Geb. d. Biochemie, IV, Wien (1958).
7. Junge-Hülsing, G. u. W.H. Hauss,
in: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 83, 1960.
8. Buddecke, E.,
in: D-Glucose (Bartelheimer, H., W. Heyde u. W. Thorn, eds.)
Enke Verlag, Stuttgart, 1966.
9. Meyer, K.,
Adv. Protein Chem. 2, 254, (1945).
10. Meyer, K., Ph. Hoffmann u. A. Linker,
in: Connective Tissue, Oxford, 1957.
11. Kuhn, R. u. H.J. Leppelmann,
Lieb. Annal. Chem. 611, 254, (1958).
12. Buddecke, E. u. M. Sziegoleit,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 337, 66, (1964)

13. Henderson, A.E. u. J.D.B. Mac Dougall,
Biochem.J. 62, 517, (1956).
14. Campo, R.D. u. D.D. Dziewiatkowski,
J. Biol. Chem. 237, 2729, (1962).
15. Brimacombe, J.S. u. J.M. Webber,
Elsevier, Amsterdam, 1964.
16. Muir, H.,
in: International Review of Connective Tissue Research,
Bd. II (Hall, D.A., ed.),
Academic Press, New York, 1964.
17. Schallock, G.,
in: Handbuch prakt. Geriatrie (Doberauer, W., Hrsg.),
Stuttgart, 1965.
18. Schiller, S., M.B. Mathews, J.A. Cifonelli u. A. Dorfmann,
J. Biol. Chem. 218, 139, (1956).
19. Sobel, H.,
Advanc. Gerontol. Res. 2, 205, (1967).
20. Greiling, H. u. H.W. Stuhlsatz,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 449, (1969).
21. Krötz, W. u. E. Buddecke,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 665, (1967).
22. Grosh, P., T.K. Taylor u. K.G. Braund,
Gerontology 23, 99, (1977).
23. Kaplan, K. u. K. Meyer,
Nature 183, 1267, (1959).
24. Shetlar, M.R. u. Y.F. Masters,
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90, 31, (1955).
25. Stidworthy, G., Y.F. Masters u. M.R. Shetlar,
J. Geront. 13, 10, (1958).

26. Mathews, M.B. u. S. Glagov,
J. Clin. Invest. 45, 1103, (1966).
27. Kresse, H., U. Stein u. E. Buddecke,
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 7, 45, (1969).
28. Gower, W.E. u. V. Pedrini,
J. Bone Joint Surg. Amer. 51, 1154, (1969).
29. Sames, K.,
Med. Diss., Institut für Physiologische Chemie, Münster 1971.
30. Tsiganos, C.P. u. H. Muir,
in: Connective Tissue and Ageing (Vogel, H.G., ed.),
Excerpta Medica, Amsterdam, 132, 1973.
31. Greiling, H. u. G. Baumann,
in: Connective Tissue and Ageing (Vogel, H.G., ed.),
Excerpta Medica, Amsterdam, 160, 1973.
32. Buddecke, E.,
Verh. Dtsch. Ges. Path. 59, 43, (1975).
33. Jackson, D.S. u. J.P. Bentley,
in: Treatise on Collagen (Gould, B.S., ed.),
Academic Press, New York, N.Y., Vol. 2A, 189, 1968.
34. Laurent, T.C., A. Wasteson u. B. Ölbriik,
in: Aging of Connective and Skeletal Tissue
(Engel, A. u. Larsson, T., eds.),
Nordsiska Bokhandel, Stockholm, 65, 1969.
35. Lowther, D.A., B.P. Toole u. A.C. Herrington,
in: Chemistry and Molecular Biology of the Inter-
cellular Matrix (Balazs, E.A., ed.),
Academic Press, New York, N.Y., Vol. 2, 1135, 1970.
36. Mathews, M.B.,
in: Chemistry and Molecular Biology of the Inter-
cellular Matrix (Balazs, E.A., ed.),
Academic Press, New York, N.Y., Vol. 2, 1155, 1970.

37. Öbrink, B.,
Diss., Department of Medical Chemistry, University of
Uppsala, Uppsala 1971.
38. Lee, J.W.N.V. u. J.C.Anderson,
Biochem.J.153(2), 259, (1976).
39. Ananthanarayanan, S. u. M.E.Nimni,
in: Extracellular Matrix Influences on Gene Expression
(Slavkin, H.C. u. Greulich, R.C., eds.),
Academic Press, Inc., New York, N.Y., USA; London, England.
ISBN 0-12-64360-4, 311, 1975.
40. Greenwald, R.A., C.E.Schwartz u. J.O.Cantor,
Biochem.J.145(3), 601, (1975).
41. Hascall, V.C. u. D.Heinedard,
J.Biol.Chem.249, 4232, (1974).
42. Heinegard, D. u. V.C.Hascall,
J.Biol.Chem.249, 4250, (1974).
43. Hardingham, T.E. u. H.Muir,
Biochem.Biophys.Acta 279, 401, (1972).
44. Hardingham, T.E. u. H.Muir,
Biochem.J.139, 565, (1974).
45. Wellauer, P., T.Wyler u. E.Buddecke,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.353, 1043, (1972).
46. Rosenberg, L., W.Hellmann u. A.K.Kleinschmidt,
J.Biol.Chem.250, 1877, (1975).
47. Hascall, V.C. u. W.S.Sajdera,
J.Biol.Chem.244, 77, (1969).
48. Hascall, V.C. u. W.S.Sajdera,
J.Biol.Chem.244, 2385, (1969).

49. Husmann, K.,
Med.Diss., Institut für Physiologische Chemie, Münster 1975.
50. Buddecke, E. u. K. Sames,
in: Molekulare und zelluläre Aspekte des Alterns
(Platt, D. u. H.-G. Lasch, Hrsg.)
Schattauer-Verlag, Stuttgart, 69, 1971.
51. Amad, O.R., G. Werner u. H. Neukom,
Biochem. Med. 16, 169, (1976).
52. Heinegard, D.,
J. Biol. Chem. 252, 1980, (1977).
53. Schiller, S., M. B. Mathews, L. Goldfaber, J. Ludowieg u. A. Dorfman,
J. Biol. Chem. 212, 531, (1955).
54. Schiller, S., M. B. Mathews, J. A. Cifonelli u. A. Dorfman,
J. Biol. Chem. 218, 139, (1956).
55. Lindner, J.,
in: Connective Tissue and Ageing (Vogel, H.G., ed.),
Excerpta Medica, Amsterdam, 119, 1973.
56. Wasteson, A., K. Lindahl u. A. Hallein,
Biochem. J. 130, 729, (1972).
57. Van de Loo, H.M.,
Analytical Biochem. 76, 556, (1976).
58. Kurz, G. u. K. Wallenfels,
in: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.),
Verlag Chemie, Weinheim, 1241, 1970.
59. Bitter, T. u. H. Muir,
Anal. Chem. 4, 330, (1962).
60. Lowry, O.H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr u. R. J. Randahl,
J. Biol. Chem. 193, 265, (1951).

61. Hanano,A.,
Med.Diss.,Institut für Physiologische Chemie,Münster 1975.
62. Hiyama,K. u. S.Okada,
J.Biochem.78, 1183; J.Biol.Chem.250, 1824, (1975).
63. Hiyama,K. u. S.Okada,
J.Biochem.80, 1201, (1976).
64. Hiyama,K.,
J.Biochem.80, 1209, (1976).
65. Yamagata,T.,H.Saito,O.Habuchi u. S.Suzuki,
J.Biol.Chem.243, 1523, (1968).
66. Saito,H.,T.Yamagata u. S.Suzuki,
J.Biol.Chem.243, 1536, (1968).
67. Kresse,H.,I.Filipovic,F.Wessels,G.Wessels u. E.Buddecke,
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.9, 21, (1971).
68. Inerot,S.,D.Heinegard,L.Audell u. S.E.Olsson,
Biochem.J.169, 143, (1978).

9.0 Lebenslauf

Am 24.10.1950 wurde ich, der zweitälteste von drei Söhnen des Arztes Dr. Wilhelm Triphaus und seiner Ehefrau Maria, geborene Holler, in Meppen/Ems geboren.

Nach vier Grundschuljahren kam ich Ostern 1961 zum Gymnasium Meppen, an dem ich am 21. Mai 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend war ich zwei Jahre als Praktikant in einer Apotheke tätig und habe am 6. Juli 1971 die pharmazeutische Vorprüfung bestanden. Nach abgelegtem Vorexamen arbeitete ich bis 31. Jan. 1973 in meiner ehemaligen Lehrapotheke.

In der Zeit vom 1. Febr. bis 31. März 1973 machte ich einen zweimonatigen Krankenpflegedienst. Ab 1. April 1973 leistete ich einen Teil meines Grundwehrdienstes in der Sanitätseinheit Leer/Ostfr. ab.

Zum Wintersemester 1973 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum.

Nach vier Semestern bestand ich am 25.8.1975 die "Ärztliche Vorprüfung", nach zwei Semestern am Klinikum Essen am 31.8. 1976 den "Ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung".

Im Wintersemester 1976/77 setzte ich das klinische Studium an der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster fort und legte dort am 31.8.1978 den "Zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung" ab.

Am 15. Okt. 1978 nahm ich die klinisch-praktische Ausbildung (Praktisches Jahr) an den Städtischen Kliniken in Dortmund auf, um im Winter 1979/80 mit dem "Dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung" mein Studium der Humanmedizin zu beenden.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1976 bis September 1977 im Institut für Physiologische Chemie durchgeführt.

